



HAL
open science

La libération modifiée de principes actifs, développement de deux approches

Bérengère Dekyndt

► **To cite this version:**

Bérengère Dekyndt. La libération modifiée de principes actifs, développement de deux approches. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S005 . tel-01255232

HAL Id: tel-01255232

<https://theses.hal.science/tel-01255232>

Submitted on 13 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LILLE 2 – DROIT ET SANTÉ
ECOLE DOCTORALE – BIOLOGIE SANTÉ

THESE DE DOCTORAT

Spécialité « Pharmacie en sciences physico-chimiques et Ingénierie appliquée à la santé »

DEKYNDT Bérengère

**LA LIBÉRATION MODIFIÉE DE PRINCIPES ACTIFS,
DÉVELOPPEMENT DE DEUX APPROCHES**

Thèse dirigée par **Pr. Sébastien DHARANCY** – Directeur

Dr Christel NEUT - Encadrant

Soutenue le 19 Janvier 2015

Composition du jury :

Monsieur DHARANCY Sébastien	Professeur à l'Université de Lille 2 - Praticien Hospitalier au CHRU de Lille
Madame NEUT Christel	PhD à l'Université de Lille 2
Monsieur SIEPMANN Juergen	Professeur à l'Université de Lille 2
Monsieur LAGARCE Frédéric	Professeur à l'Université d'Angers – Praticien Hospitalier au CHU d'Angers <u>Rapporteur</u>
Madame LEPAGE Patricia	PhD à l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) de Jouy en Josas <u>Rapporteur</u>
Monsieur WILS Daniel	ROQUETTE Frères

« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire. »

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »

de Marie Curie

Remerciements

Au Professeur Sébastien Dharancy,

Merci d'avoir accepté de diriger mon travail. Vous avez toujours été de bons conseils et je vous remercie pour votre sympathie, votre gentillesse et votre disponibilité.

A Christel Neut,

Merci beaucoup pour l'encadrement de ma thèse, de m'avoir acceptée au sein du laboratoire de Bactériologie et de m'avoir aidée au quotidien dans ce projet de recherche. Je vous remercie pour votre aide précieuse, pour vos enseignements et votre patience.

Au Professeur Juergen Siepmann,

Merci beaucoup de m'avoir accueillie dans le laboratoire de Pharmacotechnie Industrielle. Merci pour vos précieux conseils, pour la transmission de vos connaissances et surtout pour votre patience.

Au Professeur Frédéric Lagarce,

Merci d'avoir accepté et d'avoir pris le temps de juger mon travail.

A Mme Patricia Lapage,

Merci d'avoir accepté et d'avoir pris le temps de juger mon travail.

A Mr Daniel Wils,

Merci d'avoir accepté et d'avoir pris le temps de juger mon travail.

A mes parents,

Merci pour tout ! Merci pour votre confiance, votre écoute, votre compréhension, vos conseils, vos encouragements, votre soutien, merci surtout pour votre patience et pour tout votre amour ! Merci infiniment.

A Romain,

Merci pour ta présence, ton soutien, ton réconfort, ta patience et ton amour depuis ces huit dernières années. Merci de m'accompagner et de te projeter avec moi dans ces nombreux projets.

A Amandine, Yassine, Marius et les animaux...

Merci beaucoup pour votre bonne humeur, votre soutien, votre lointaine présence, et surtout pour votre amour ! Merci pour le plus beau des cadeaux que vous avez fait à toute la famille. Merci Amandine pour ta persévérance à essayer de me faire relativiser, et pour notre grande complicité. La famille est plus importante que tout et je m'efforcerai d'en faire toujours ma priorité.

A ma famille,

Merci à vous tous, pour votre soutien, votre bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble. Merci mamie Victorine, Marie-Catherine, Richard, Anne-Sophie, Thomas, Sylvain, Polochon et tous les autres...

Merci à Christine et Régis de faire partie de la famille. Merci encore pour votre soutien, vos encouragements et votre compréhension.

A mes amis,

Merci pour votre présence depuis toutes ces années, pour tous les bons moments de divertissement. Merci entre autres à Chloé, Laure, Camille, Eva mais aussi à Alexia, Clara, Florence, Stéphanie. Merci à Valentin, Chloé, Jean-Mich, Esther, Alexquis, Fanny, Jérôme, Constance, Cécile, Stéphane, Mathilde, Julien, Aurélie, Marc, Amandine, Perrine, Émilie et Mathieu pour cette grande famille qui ne cesse de s'agrandir.

Au laboratoire de Bactériologie, et l'Unité INSERM U995,

Merci à Mr Desreumaux et toute l'Unité INSERM U995. Merci à Guillaume Pineton de Chambrun et tout le service de Gastro-entérologie de l'hôpital Huriez pour leur collaboration dans ce projet.

Merci à Carole, Séverine, Isabelle, Marie, Oumaira et Charlotte pour votre grande écoute, votre soutien et votre bonne humeur.

Merci infiniment à Jeremy pour tout le travail que tu as abattu pour m'aider à avancer dans ce projet. Merci pour ton courage, ton sérieux, tes idées et pour ta bonne humeur aussi !

Merci encore à Rémi pour ton esprit critique, ta grande aide pour les statistiques et pour ta grande disponibilité.

Au laboratoire de Pharmacotechnie Industrielle, et l'Unité INSERM U1008,

Merci à Mr et Mme Siepmann, Mme Gayot, et Mme Flament de m'avoir accueillie dans le laboratoire de Pharmacotechnie Industrielle pour ce projet. Merci pour leurs précieux conseils et pour la transmission de leurs connaissances. Merci également à toute l'unité INSERM U1008 pour les échanges et les conseils.

Merci à tous pour l'entraide au quotidien, à Susana, Mickael, Maria, Haong, Phuong (et bébé Phuong), Alexis, Hanane, Céline, Julie, Esther, Emilie, Golf, Mounira, Hugues, Muriel et Youness. Merci aussi à tous les étudiants de passage que je n'ai pas cités mais qui contribuent fortement à l'esprit joyeux du laboratoire. Merci beaucoup à Susanne pour ta disponibilité, tes conseils et ton esprit critique.

Et un très grand merci à Carine pour ton amitié, ton soutien et tes encouragements.

Au laboratoire de Biopharmacie et Pharmacie Galénique Hospitalière,

Un grand merci à Mr Odou et Mr Décaudin pour votre formation, votre grande aide et votre patience.

Merci à Mme Berthélémy, Damien, Nicolas et Marie-Andrée et tous les autres pour vos précieux conseils.

Au laboratoire de Biophysique,

Merci pour votre grande aide, pour mon intégration dans l'équipe, et votre bonne humeur.

Au personnel de la Pharmacie Centrale du CHRU de Lille,

Avec qui j'ai eu l'honneur de travailler, merci pour la formation que j'ai reçue durant ces années d'Internat.

Un merci particulier à Michèle d'avoir accepté de juger mon travail de thèse de DES, d'être souvent disponible et de très bons conseils.

A toute l'équipe des services de Médecine Nucléaire de l'hôpital Huriez et Salengro du CHRU de Lille,

Merci à Jean François pour ton accueil, ta formation, tes bons conseils, ta bonne humeur et pour tous les beaux projets professionnels que tu me fais partager.

Merci à Thierry et Alexandre pour vos enseignements et votre bonne humeur.

Merci à Mr Huglo et Mr Semah pour votre accueil et votre confiance.

Et merci à toute l'équipe pour votre accueil et votre gaieté au quotidien.

Merci à tous les autres que je n'ai pas cités et que j'ai eu la chance de rencontrer dans le cadre professionnel ou personnel et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à arriver jusqu'ici.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	17
I. LA LIBERATION CONTROLEE DES PRINCIPES ACTIFS A ADMINISTRATION ORALE	18
1. <i>Définitions des systèmes d'administration des médicaments</i>	<i>18</i>
2. <i>Le contrôle de la libération des PAS des formes solides à administration orale.....</i>	<i>20</i>
La libération accélérée	20
La libération prolongée.....	21
La libération retardée	21
La libération séquentielle.....	22
3. <i>La libération ciblée colique des principes actifs</i>	<i>22</i>
Les différentes stratégies de formulation galénique pour le ciblage colique [26]	24
Les prodrogues et azopolymères	24
La pression luminale.....	24
Polymères sensibles au temps.....	25
Polymères sensibles au pH.....	27
Polymères sensibles aux enzymes bactériennes de la flore intestinale	28
Problématique.....	28
4. <i>La libération soutenue, d'ordre zéro, des principes actifs</i>	<i>29</i>
Les systèmes multiparticulaires	32
Les polymères.....	32
Les techniques d'enrobage.....	33
Formations des films	34
Les techniques d'analyses des formulations	35
Problématique.....	35
II. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN	36
1) <i>Définition.....</i>	<i>36</i>
2) <i>Epidémiologie.....</i>	<i>36</i>
3) <i>Signes cliniques.....</i>	<i>37</i>
4) <i>Etiologie.....</i>	<i>37</i>
Epithélium intestinal, système immunitaire et inflammation.....	38
Génétique.....	38
Environnement.....	39
5) <i>Diagnostic</i>	<i>40</i>
6) <i>Traitements.....</i>	<i>41</i>
a) <i>Traitements médicamenteux.....</i>	<i>41</i>
Les anti-inflammatoires	41
Les aminosalicylates.....	41
Les corticostéroïdes.....	42
Les antimétabolites : Thiopurines et Méthotrexate	43
Les biothérapies :	43
Infliximab	43

Adalimumab	44
Les traitements symptomatiques :	44
Les antalgiques	44
Les antibiotiques	45
Les antidiarrhéiques.....	45
b) Alimentation artificielle	46
c) Les traitements chirurgicaux	46
d) Les règles hygiéno-diététiques	47
III. OBJECTIFS DU TRAVAIL	48
IV. REFERENCES	50
CHAPITRE I	59
REVUE CRITIQUE DES METHODES DE TEST DE LIBERATION DE PRINCIPES ACTIFS A CIBLAGE COLIQUE A PARTIR DE FORMULATIONS SOLIDES SENSIBLES AUX ENZYMES BACTERIENNES.....	59
I. INTRODUCTION.....	61
II. INTERET, PORTEE ET DESCRIPTION D'UNE STRATEGIE SPECIFIQUE POUR LA CONCEPTION DE FORMULATIONS A LIBERATION COLIQUE	62
1. <i>Intérêt et portée</i>	62
2. <i>Les formulations sensibles aux enzymes bactériennes, une stratégie spécifique</i>	65
a) La microflore intestinale et ses activités métaboliques	65
b) Les polymères spécifiquement digérés par la microflore colique et les principaux polysaccharides adaptés pour le ciblage colique	68
Dextrines.....	69
Inuline	71
Pectine.....	71
Chitosan.....	72
Galactomannane	72
Alginate.....	73
Arabinoxylane.....	73
Chondroïtine sulfate	73
III. LES METHODES DE TEST <i>IN VITRO</i>	76
1. <i>Les dispositifs généralement utilisés</i>	76
2. <i>La simulation des compartiments du tube digestif</i>	78
a) La simulation du compartiment gastrique.....	78
b) Les conditions simulant l'intestin grêle	78
c) La simulation des conditions coliques	79
Le tampon Phosphate.....	79
Le tampon phosphate pur.....	79
Le tampon phosphate ne présence d'enzyme de bactérie colique.....	80
Tampon phosphate avec du contenu caecal de rats	81

Tampon phosphate avec des selles fraîches de rats.....	82
Tampon phosphate avec des échantillons fécaux frais humains.....	83
Milieu de culture.....	84
Milieu de culture avec des selles fraîches de rats.....	84
Milieu de culture inoculé avec des cultures pures de bactéries du côlon humain.....	84
Milieu de culture inoculé avec un échantillon de selles fraîches humaines.....	84
3. <i>Le système de culture en continu : l'exemple du SHIME</i>	86
IV. LES METHODES <i>IN VIVO</i>	88
1. <i>Les modèles animaux</i>	88
a) Coeliotomie.....	88
b) Etude cinétique plasmatique.....	88
c) Caractères histopathologiques.....	89
d) L'imagerie.....	89
2. <i>Les méthodes in vivo chez l'Homme</i>	91
a) Dosages dans des fluides ou contenus physiologiques.....	91
b) Radiographie et scintigraphie.....	92
V. CONCLUSION.....	93
VI. REFERENCES.....	94
CHAPITRE 2.....	108
LA STRATEGIE DE CIBLAGE COLIQUE UTILISANT DES FORMULATIONS SENSIBLES AUX ENZYMES BACTERIENNES, EST-ELLE ENCORE EFFICACE CHEZ LES PATIENTS TRAITES PAR ANTIBIOTHERAPIE?.....	108
I. INTRODUCTION.....	111
II. MATERIELS ET METHODES.....	112
1) <i>Matériels</i>	112
2) <i>Préparation des minigranules chargées de substance active</i>	113
3) <i>Préparation des minigranules enrobées</i>	113
4) <i>Préparation du milieu de culture</i>	114
5) <i>Préparation des échantillons fécaux</i>	114
6) <i>Patients</i>	115
7) <i>Les études de libération de la substance active</i>	116
a) Test de libération dans le haut tractus gastro-intestinal (HTGI).....	116
b) Test de libération dans les conditions coliques.....	116
8) <i>Analyse bactériologique</i>	117
9) <i>Analyse statistique</i>	118
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	118
1) <i>Libération dans le haut tractus gastro-intestinale (HTGI)</i>	118
2) <i>La libération colique</i>	120

3) Analyse statistique	129
4) Dénombrement bactérien	130
5) Souches isolées et mélange de souches isolées.....	134
6) Perspectives.....	136
IV. CONCLUSIONS	137
V. REFERENCES.....	139
CHAPITRE 3	144
COMMENT OBTENIR, D'UNE MANIERE RELATIVEMENT SIMPLE, UNE LIBERATION D'ORDRE ZERO DE PRINCIPES ACTIFS TRES SOLUBLES A PARTIR DE FORMES SOLIDES ENROBEES	144
I. INTRODUCTION.....	146
II. MATERIEL ET METHODES	148
1) Matériels.....	148
2) Préparation des minigranules enrobées.....	148
3) Les études de libération de la substance active.....	149
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	149
1) Une couche unique de polymère.....	149
2) Alternance de couches de polymère	153
3) Alternance de couches de substance active et de couches de polymère	159
IV. CONCLUSIONS	164
V. REFERENCES.....	165
CONCLUSION GENERALE	169
REFERENCE	173
RESUMES.....	174
I. RESUME EN FRANÇAIS.....	175
VII. RESUME EN ANGLAIS.....	177
ANNEXE 1:	179
CRITICAL REVIEW OF DRUG RELEASE TEST METHODS FOR COLON TARGETED BACTERIALLY DEGRADABLE SOLID FORMULATIONS.....	179
I. INTRODUCTION.....	180
II. INTEREST, SCOPE AND SPECIFIC STRATEGY FOR DESIGNING COLON-TARGETED FORMULATIONS.....	181
1. Interest and scope	181
2. Bacterially degradable formulation, a specific strategy.....	183
a) The intestinal microbiota and its metabolic activity	183

b) Polymers specifically digested by the colonic microflora and principal polysaccharides suitable for colon targeting.....	186
Dextrins.....	186
Inulin.....	188
Pectin.....	188
Chitosan.....	189
Galactomannan.....	189
Alginate.....	190
Arabinoxylan.....	190
Chondroitin sulfate.....	190
III. <i>IN VITRO</i> TEST METHODS.....	193
1. <i>General use devices</i>	193
2. <i>Gut's compartment simulation</i>	195
a) Gastric conditions simulation.....	195
b) Small intestine conditions simulation.....	195
c) Colonic conditions simulation.....	196
Phosphate buffer.....	196
Pure phosphate buffer.....	196
Phosphate buffer with colonic bacteria enzymes.....	196
Phosphate buffer with rats' caecal content.....	197
Phosphate buffer with rats' fresh faeces.....	199
Phosphate buffer with human fresh faecal sample.....	199
Culture medium.....	200
Culture medium with rats' fresh faeces.....	200
Culture medium inoculated with pure cultures of human colonic bacteria.....	201
Culture medium with human fresh faecal sample.....	201
3. <i>Continuous culture system: the example of SHIME</i>	202
IV. <i>IN VIVO</i> METHODS.....	204
1. <i>Animal models</i>	204
2. <i>Human in vivo method</i>	207
V. CONCLUSION.....	210
VI. REFERENCES.....	211
ANNEXE 2:.....	224
IS THE MICROBIALLY-TRIGGERED COLON -TARGETING STRATEGY STILL EFFICIENT IN PATIENTS TREATED BY ANTIBIOTICS?.....	224
I. INTRODUCTION.....	225
II. MATERIALS AND METHODS.....	226
1) <i>Materials</i>	226
2) <i>Preparation of drug-loaded pellet cores</i>	227
3) <i>Preparation of coated pellets</i>	227

4) Preparation of culture medium.....	228
5) Fecal sample preparation.....	228
6) Patients.....	229
7) Drug release studies.....	230
8) Bacteriological analysis.....	231
9) Statistical analysis.....	231
III. RESULTS AND DISCUSSION.....	231
1) Upper gastrointestinal tract release.....	231
2) Colonic release.....	234
3) Statistical analysis.....	242
4) Bacterial count.....	243
5) Isolated strains and mixture of strains.....	247
6) Prospects.....	249
IV. CONCLUSIONS.....	250
V. REFERENCES.....	252
ANNEXE 3:	256
HOW TO PROVIDE ZERO ORDER RELEASE FOR FREELY SOLUBLE DRUGS FROM COATED PELLETS IN A RELATIVELY SIMPLE MANNER	256
I. ABSTRACT.....	258
II. INTRODUCTION.....	259
III. MATERIALS AND METHODS.....	260
1) Materials.....	260
2) Preparation of coated pellets.....	261
3) Drug release studies.....	262
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	262
1) Single polymer layers.....	262
2) Sequential polymer layers.....	266
3) Sequential drug and polymer layers.....	271
V. CONCLUSIONS.....	275
VI. REFERENCES.....	276

Liste des Abréviations

5-ASA =	5-amino salicylique acid ou acide A-aminosalicylique
5-FU =	5-Fluorouracil ou 5-Fluorouracile
6-MP =	6-Mercaptopurine
AE =	Adverse event
AIEC =	Adherent-invasive E. coli bacteria
AINS =	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALD =	Affection Longue Durée
ANCA =	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires
ARN =	Acide ribonucléique
ASCA =	Anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae
ATB =	Antibiotic ou Antibiotique
ATG16L1 =	Autophagy-related 16-like 1 gene
AZA =	Azathioprine
BCG =	Bacillus Calmette–Guérin
CARD 15 =	Caspase Recruitment Domain-containing protein 15
CD3 =	Classes de différenciation 3
CDAI =	Crohn's Disease Activity Index
CFU =	Colony forming Unit
CLSM =	Confocal laser scanning microscope = microscopie confocale à balayage laser
CRP =	Protéine C réactive
DLG 5 =	Discs Large Gene

EC	=	Ethylcellulose
ECCO	=	European Crohn's and Colitis Organisation
ECD	=	Ethylcellulose Dispersion
EDX	=	Energy Dispersive X-Ray
EI	=	Effets indésirables
EMA	=	Ethyl methacrylate
EPIMAD	=	Etude Prospective d'Incidence des MICI dans le Nord-Ouest de la France
EPR	=	Electronique para-résonance magnétique
GE	=	Gastro esophageal
GI	=	Gastrointestinal
GIT	=	Gastrointestinal tract
HAS	=	Haute Autorité de Santé
HCl	=	Acide chlorhydrique
HMGCS2	=	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
HPC	=	Hydroxypropyl cellulose
HPMC	=	Hydroxypropyl methylcellulose
HTGI	=	Haut tractus gastrointestinal
IBD	=	Inflammatory Bowel Disease
ICAM1	=	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL2	=	Interleukine 2
IRGM	=	Immunity-related GTPase family M protein
IRM	=	Imagerie par résonance magnétique

IV	=	Intra-veineuse
LVSA	=	Low-viscosity sodium alginate
MC	=	Maladie de Crohn
MCC	=	Microcrystalline cellulose
MDP	=	Muramyl dipeptide
MEB	=	Microscopie électronique à balayage
MFA	=	Microscopie à force atomique
MICI	=	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MMX	=	Multi Matrix system
mRNA	=	Messenger RNA ou acide ribonucléique messager
ND	=	Not Documented
NF κ B	=	Nuclear factor κ B
NOD 2	=	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OCTN	=	Organic Cation Transporter
OROS-CT®	=	Oral Osmotic System for Colon Targeting
PA	=	Principe actif
PBS	=	Phosphate buffered saline ou tampon Phosphate salin
PCR	=	Polymerase chain reaction
PPAR- γ	=	Peroxisome proliferator-activated receptors γ
PRC	=	Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne de la Polymérase)
PVA	=	Polyvinyl acetate
PVA-PEG	=	Polyvinyl acetate greffé à du polyéthylène glycol
PVAc	=	Polyvinyl Acetate

RC	=	Ringer Cystéiné
RCH	=	Rectocolite hémorragique
RMN	=	Résonance magnétique nucléaire
Rnase	=	Ribonuclease
ROR	=	Rougeole-Oreillons-Rubéole
rpm	=	Rotation par minute
SA	=	Substance active
SCFA	=	Short-chain fatty acids ou acide gras à chaîne courte
SEM	=	Scanning electron microscopy
SHIME	=	Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem
SR	=	Sustained-release
TGI	=	Tractus Gastrointestinal
TLR	=	Toll-like receptors
TNBS	=	Trinitrobenzenesulfonic acid
TNF	=	Tumor Necrosis Factor
UC	=	Ulcerative Colitis
UCEIS	=	Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity
USP	=	United State Pharmacopeia
UV	=	Ultraviolet
w/v	=	Weight/volume
w/w	=	Weight/weight

Introduction générale

I. La libération contrôlée des principes actifs à administration orale

1. Définitions des systèmes d'administration des médicaments

Il existe de nombreuses voies d'administration de principes actifs (PA): locale (transmucosale), entérale (orale, rectale, sublinguale) et parentérale (injectable). Grâce à sa simplicité et à son confort d'utilisation, la voie orale est la voie d'administration des PAs la plus utilisée : 84% des cinquante médicaments les plus distribués pour les marchés américains et européens sont administrés par cette voie [1]. Elle présente des avantages tels que la facilité d'emploi, l'absence de douleur à l'administration et surtout la réduction du risque infectieux. De plus, elle permet des traitements en ambulatoire et une production industrielle relativement facile. Elle présente néanmoins des inconvénients. En effet, pour que le PA puisse avoir un effet thérapeutique par voie orale, il faut que celui-ci soit absorbé au bon endroit à travers la barrière digestive pour être présent en quantité suffisante dans la circulation sanguine le plus longtemps possible.

Pour que le PA exerce de façon efficace son activité thérapeutique, il est nécessaire que sa concentration sanguine atteigne un taux suffisant pour un effet thérapeutique mais pas supérieur au seuil de toxicité. Cette fourchette de concentration sanguine est nommée la zone thérapeutique (Figure 1).

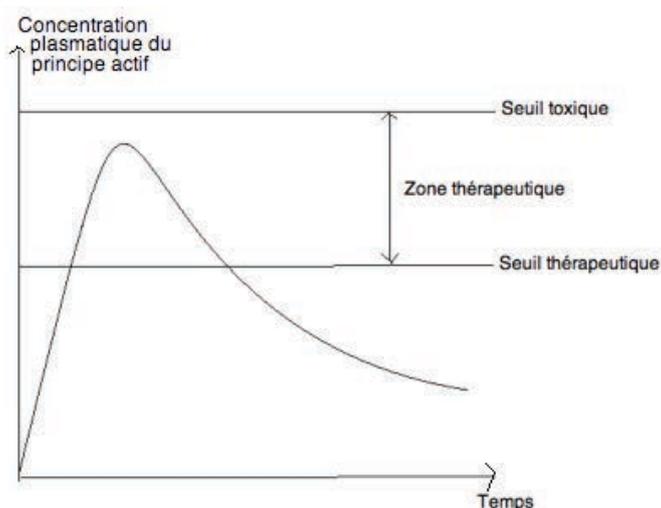


Figure 1 Schéma de la zone thérapeutique

Ainsi, pour satisfaire ces exigences d'absorption et de concentration sanguine, l'administration orale requiert certaines exigences telles que:

- La solubilité du PA dans le tube digestif
- L'absorption du PA à travers la barrière gastro-intestinale
- La distribution du PA à travers l'organisme jusqu'à sa cible.

La forme pharmaceutique est une présentation du PA qui peut néanmoins participer à son activité thérapeutique. Les systèmes d'administration des médicaments consistent en des formulations ou des technologies permettant au PA de satisfaire aux exigences citées précédemment et d'atteindre sa cible pour y exercer son action thérapeutique. Ces systèmes d'administration sont primordiaux pour une administration efficace, sûre et pratique.

Ainsi, pour améliorer l'efficacité des PAs, des systèmes d'administration existent pour moduler leur solubilité [2], restreindre leur libération à un site spécifique [3], [4], ou réduire leur dégradation indésirable dans l'estomac ou dans la circulation sanguine [5], [6]. Les systèmes d'administration peuvent également promouvoir la sécurité d'utilisation des PAs en réduisant les effets indésirables systémiques [7], [8], en empêchant la libération du PA au niveau de l'estomac et par conséquent en évitant les lésions gastriques [9], ou au niveau des tissus sains [10], [11]. Enfin, les comprimés de désintégration orale [12], [13] et les formulations masquant le goût [14] sont d'excellents exemples de systèmes d'administration visant à améliorer l'adhésion du patient à son traitement [15].

Les enrobages sont utilisés pour les formulations solides pour des raisons décoratives, de protection, et pour des raisons fonctionnelles. Ces enrobages sont généralement appliqués par un procédé de pulvérisation atomique, où le polymère est pulvérisé sur le substrat solide. Les formes pharmaceutiques enrobées sont les plus abondantes et proposent de nombreux avantages tels que la libération « temps-dépendante », le masquage de goût, la protection contre l'humidité, la libération site-spécifique pour cibler des portions du tube digestif, la facilité d'administration, une biodisponibilité accrue, une meilleure stabilité à long terme ainsi qu'une facilité d'identification du produit et l'amélioration de l'aspect esthétique. C'est pourquoi de nombreux produits médicamenteux sur le marché sont des formes pelliculées et les progrès dans la conception de formulation pharmaceutique, les techniques de fabrication et les méthodes de caractérisation ont une grande importance pratique.

2. Le contrôle de la libération des PAs des formes solides à administration orale

La phase d'absorption des PAs est intimement liée à la phase de libération de sa formulation galénique et de dissolution dans le milieu biologique correspondant au site d'administration. Ainsi la phase de libération et celle de dissolution sont les facteurs limitant la phase d'absorption. Ces facteurs limitant sont les outils de la conception des formes à libération modifiée. La vitesse de libération du PA de la forme galénique peut être accélérée, retardée, ciblée par rapport à la libération immédiate grâce à des formulations, des excipients ou des processus de fabrication différents.

La Pharmacopée Européenne définit les comprimés à libération modifiée comme des « comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux, ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de la libération de la ou des substances actives. Les comprimés à libération modifiée comprennent les comprimés à libération prolongée, à libération retardée et à libération séquentielle » [16] (Figure 2).

D'autres classifications séparent les formulations à libération modifiée en formulations [17]:

- à libération retardée (par exemple, en utilisant un enrobage entérique);
- à libération « site spécifique » ou libération dans le temps (par exemple, pour une libération colique);
- à libération prolongée (par exemple, d'ordre zéro, de premier ordre, biphasique, etc.);
- à libération programmée (par exemple, pulsatile, retardée, etc.).

La libération accélérée

La libération peut être accélérée en augmentant la vitesse de désagrégation. Les comprimés effervescents, solubles, dispersibles ou orodispersibles en sont de bons exemples. La courbe plasmatique est donc décalée vers la gauche, avec une libération plus précoce.

Intérêt

La libération accélérée permet une absorption sans délai du PA et est utile pour une action pharmacologique rapide. Ces formulations permettent également de faciliter la prise médicamenteuse (s'affranchir de problème de déglutition en gériatrie ou pédiatrie), de permettre une administration par sonde naso-gastrique avec une dissolution avant

l'administration et d'augmenter la biodisponibilité notamment avec la voie sublinguale qui évite l'effet de premier passage hépatique.

La libération prolongée

La libération peut être prolongée en retenant le PA au sein d'un système contrôlant sa vitesse de libération. Le PA peut être inclus dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une matrice à partir de laquelle le PA sera libéré lentement. La libération du PA de la forme galénique peut être simplement plus lente que la libération immédiate ou elle peut être contrôlée, programmée, ou soutenue. Le profil de libération présente la forme d'une courbe croissante avec une vitesse diminuant au cours de la libération avec un maximum de PA libéré égal à celui obtenu au cours d'une libération immédiate.

Intérêts

Cette libération prolongée présente un profil cinétique dit « d'ordre zéro », indépendant du temps et des variables biologiques liées au milieu environnant et est basé sur des phénomènes physiques constants [18], [19]. Le profil de libération contrôlée correspondrait au cas du profil idéal recherché (avec une vitesse de libération qui compenserait l'élimination) et présente les avantages suivants :

- la réduction des prises journalières,
- l'accroissement du confort du malade,
- l'amélioration de l'observance du traitement,
- la diminution des effets secondaires indésirables par suppression des pics plasmatiques,

La libération retardée

La libération du PA peut être retardée dans le temps ou l'espace par rapport à la libération immédiate. Ces formulations sont appelées « formes retard ». Le profil plasmatique conventionnel est déplacé vers la droite.

Intérêt

Ces « formes retard » permettent de protéger le PA de certains paramètres du milieu environnant tels que le pH ou les enzymes du haut tractus gastro-intestinal ou de protéger les muqueuses intestinales du PA. Elles peuvent également différer la libération pour réduire le

nombre de prise médicamenteuse hebdomadaire ou d'augmenter la concentration du PA dans la seconde partie du tube digestif.

La libération séquentielle

La libération du PA peut être séquentielle ou répétée. Le profil plasmatique présente plusieurs courbes de concentration plasmatique conventionnelle qui se superposent le plus souvent pour obtenir un effet prolongé. Les systèmes à libération séquentielle ou systèmes complexes comprennent les comprimés multi-couches et les comprimés matriciels et réservoirs. Les comprimés multi-couches sont des comprimés comprenant plusieurs phases de désagrégation ou dissolution du PA. Le système complexe matriciel ou réservoir représente un comprimé contenant des minigranules enrobés par exemple.

Intérêt

Ces formulations permettent de maintenir des concentrations plasmatiques à l'intérieur de la marge thérapeutique en libérant de manière séquentielle une quantité déterminée de PA.

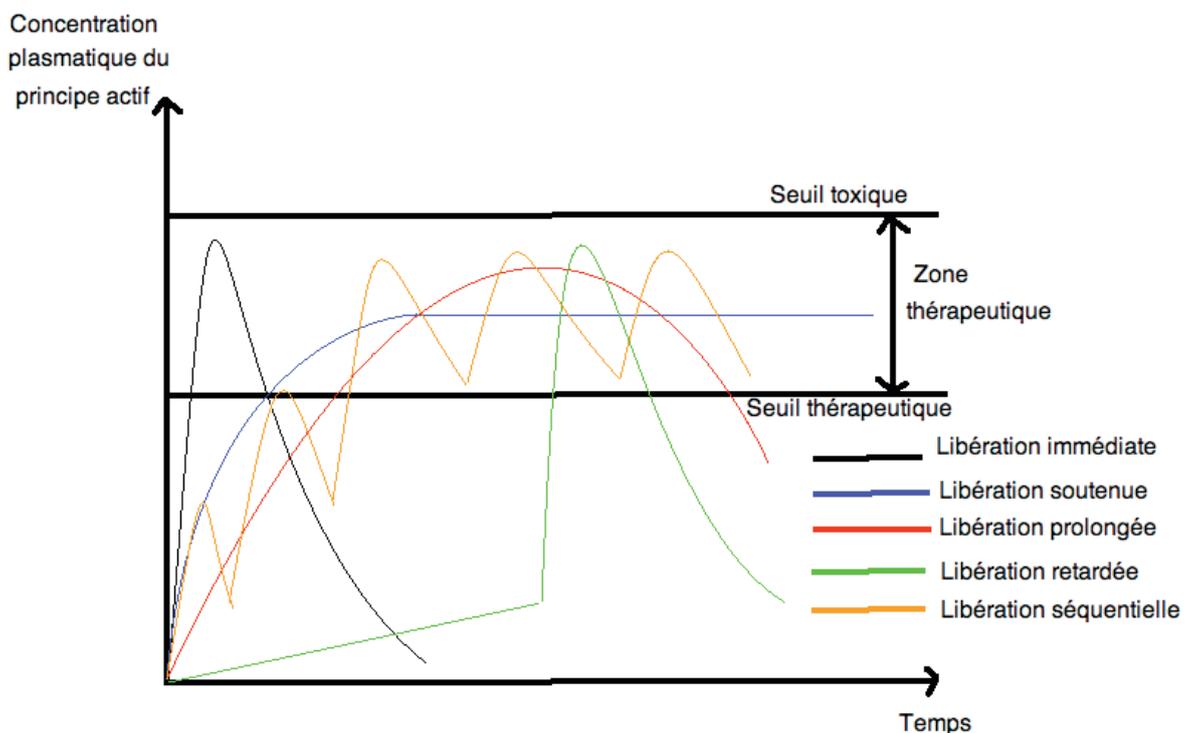


Figure 2: Les différents profils de libération des PAs des formes solides à administration orale

3. La libération ciblée colique des principes actifs

a) Présentation

La libération ciblée est une libération retardée jusqu'à un site spécifique du tractus gastro-intestinal.

La libération colique est obtenue par une formulation galénique qui s'oppose à la libération du PA durant la phase de transit dans le haut tractus gastro-intestinal : HTGI (estomac et intestin grêle) et qui est ensuite dégradée au niveau du côlon. **De nombreuses stratégies existent** pour que les formes galéniques atteignent le côlon intactes, utilisant les paramètres physico-chimiques spécifiques des différents compartiments du tractus gastro-intestinal (pH, temps de transit, densité bactérienne). **Cependant, les enrobages sensibles aux enzymes bactériennes de la microflore colique semblent être les plus spécifiques.**

Les systèmes à libération colique ont été reconnus comme présentant d'importants avantages thérapeutiques et la recherche dans ce domaine s'intensifie. Ils améliorent considérablement **le traitement de nombreuses pathologies à atteintes coliques** telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le cancer du côlon, le syndrome du côlon irritable et la constipation. La libération colique serait également utile dans **les chronothérapies**, quand, du point de vue thérapeutique, un retard à l'absorption est nécessaire, notamment dans le traitement de pathologies comme l'asthme nocturne ou l'angor [20], ou les traitements d'addiction à la nicotine. Aussi, l'absorption **des médicaments protéiques ou peptidiques** est meilleure au niveau colique. Ce phénomène est dû notamment, à une activité protéolytique nettement plus faible au niveau du côlon qu'au niveau de l'intestin grêle (sauf pour certaines enzymes telles que l'endoprotéase prolyl ou la collagénase) et à l'absence d'une activité peptidasique associée à la membrane des cellules épithéliales coliques. Il y a donc un intérêt pour l'utilisation du côlon comme site d'absorption de ces PAs peptidiques comme les analgésiques [21], les contraceptifs, les vaccins [22]–[24] ou l'insuline [25] dont l'administration se fait jusqu'à maintenant, essentiellement par voie parentérale, douloureuse et à l'origine d'une mauvaise acceptabilité. Il existe néanmoins des obstacles à l'absorption colique de certains PAs comme le PAs de faible poids moléculaire tels que les céphalosporines, les pénicillines et les aminosides qui se lient au mucus.

Plusieurs formulations innovantes répondant à cette problématique ont été décrites dans des demandes de brevets (nanoparticules, comprimés osmotiques). Cependant, aucune de ces formes n'a abouti commercialement, à cause d'un coût trop élevé à l'industrialisation du projet ou une trop haute technicité nécessaire à mettre en œuvre pour leur développement.

Les différentes stratégies de formulation galénique pour le ciblage colique [26]

Les prodrogues et azopolymères

Le principe des prodrogues consiste en l'administration d'une molécule inactive qui, **grâce à des phénomènes enzymatiques**, se transforme en une molécule active. L'utilisation de molécules dégradées par des enzymes uniquement présentes au niveau du côlon permet de cibler l'action du PA au niveau colique. Le concept de prodrogue a été **utilisé pendant des années pour la sulfasalazine** divisée par activité azoréductase colique en Acide 5-Aminosalicylique (5-ASA), le composé actif, et la sulfapyridine. Une limite à cette stratégie est que la quantité et l'activité des azoréductases peuvent varier chez les patients atteints de MICI. Cette stratégie a notamment aussi été utilisée pour la vitamine D [27] avec l'utilisation de la β -glucuronidase, présente au niveau de l'iléon et du côlon, pour libérer la forme active du PA.

Le même système existe avec les azopolymères qui consistent en des polymères réticulés par des molécules azo-aromatiques et qui peuvent être clivés par les enzymes bactériennes au niveau du côlon. Ces enrobages étaient décrits pour être utilisés pour la libération colique de PAs peptidiques ou pour des anti-inflammatoires, *in vitro* [22], [28]–[34] et *in vivo* [35].

La pression luminale

Certaines formes galéniques utilisent la pression luminale pour cibler la libération du PA au niveau du côlon [36], [37]. Cette pression luminale est due à la haute viscosité du milieu et au péristaltisme créé par les muscles lisses du côlon. Ces formes galéniques associent un **polymère résistant aux fluides du haut tractus gastro-intestinal (HTGI) et des polymères gonflant au contact des fluides du côlon et susceptible d'une rupture ciblée dans l'intestin distal**. Un bouchon de gélatine peut être par exemple placés dans une capsule enrobée de polymères résistants aux pH du HTGI [38], [39]. Le système OROS-CTTM (ALZA Corporation, Palo Alto, USA) utilise cette stratégie. Ces technologies sont utilisées pour les traitements chronothérapeutiques par exemple [38] (Figure 3).

Ces formulations présentent tout de même l'inconvénient de subir la pression osmotique du reste du tube digestif et peuvent commencer à libérer leur PA dans le HTGI. En effet, le temps de transit et les pH présents dans le HTGI peuvent tout de même influencer la libération du PA. Enfin, ces technologies sont complexes à réaliser avec des outils de préparation galénique standards.

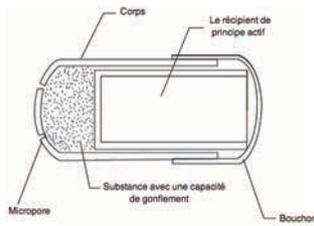


Figure 3 : Capsule temps-dépendant pour la libération colique [40].

Polymères sensibles au temps

Le temps de transit gastro-intestinal des formulations peut être divisé entre le temps de passage dans l'estomac (1h pour un estomac vide et 2h pour les conditions critiques), dans l'intestin grêle (4- 8h et peu variable, durée indépendante de l'état physique, de la présence de nourriture ou de la taille de la forme pharmaceutique administrée) et dans le côlon (24 à 48h et très variable [41]). Le temps total de transit médian pour des sujets sains est de 1,5 jours et pour des sujets malades il peut être raccourci ou allongé, il est de 2 jours par exemple pour des patients atteints de mucoviscidose [42] ou peut être gravement diminué dans d'autres pathologies telles que les MICI. Les temps de transit gastriques sont variables en fonction de l'ingestion d'aliments et sont contrôlés par des facteurs neuro-hormonaux et de boucles réflexes mises en jeu par différentes caractéristiques du chyme quittant l'estomac. Ils peuvent également être fonction des caractéristiques physiques de la formulation telles que sa taille et sa densité. Les formulations sensibles au temps sont basées sur l'utilisation de systèmes enrobés (ou moulés [43], [44] pour pouvoir séparer les processus de développement du « récipient fonctionnel » du PA contenu) de **polymères qui présentent un gonflement, une dissolution ou une érosion lentes au contact des fluides gastro-intestinaux** (amidons, carboxyméthylcellulose) **et de polymères insolubles** afin de maintenir la formulation intacte jusqu'au lieu ciblé pour la libération (éthylcellulose (EC)) [39], [45]–[48]. Ces systèmes utilisent une phase de latence de la libération suffisamment longue pour atteindre le site de libération désiré [26]. Les compositions des enrobages peuvent être très variées et peuvent conduire à de nombreux mécanismes de libération différents (Figure 4).

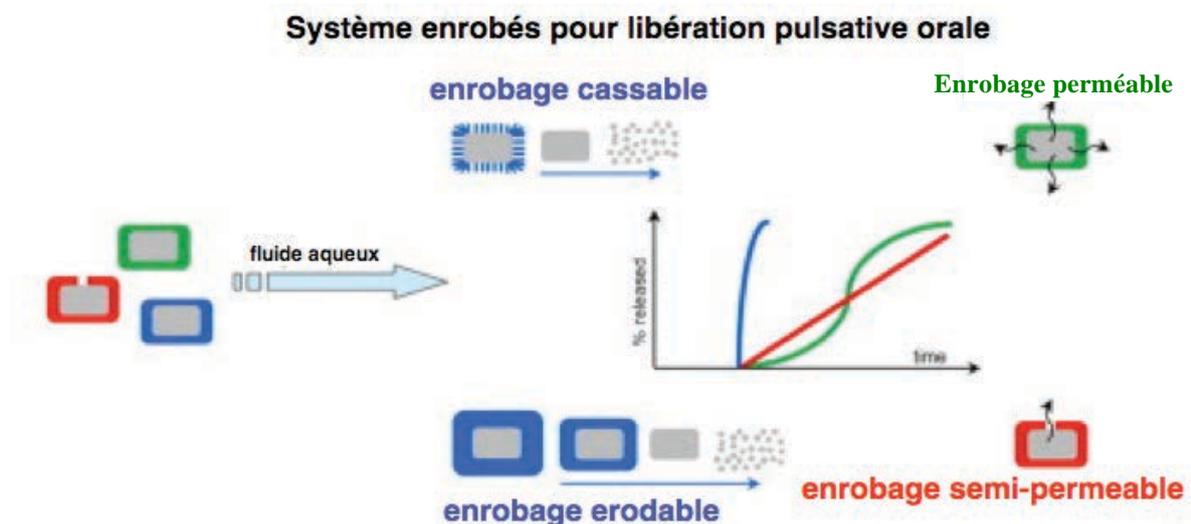


Figure 4 : Aperçu de la performance des systèmes enrobés à libération pulsative orale suite à l'exposition aux fluides aqueux [26]

Le système MMX (multi-matrix system) est une technologie brevetée qui utilise une matrice hydrophile et lipophile enrobée d'un polymère pH dépendant, gastro-résistant. L'enrobage permet la résistance de la formulation au HTGI, la matrice hydrophile gonfle avec la pression luminale et libère un gel visqueux. Le PA diffuse lentement à travers la matrice hydrophile dans la lumière du côlon [49].

Les systèmes basés sur le temps de transit **présentent de nombreux inconvénients** (variabilités des temps de vidange gastrique et de transit, phénomènes de rétention au niveau de la valvule iléo-caecale [20]). Il a été constaté, par exemple, que les formulations unitaires et les formulations de petite taille peuvent mettre trois à quatre heures pour passer à travers l'intestin grêle [50]. Il est observé chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) que les temps de transit à travers le côlon sont plus rapides que chez les sujets sains dus à la diarrhée. Les formulations dépendantes du temps peuvent débuter leur libération au niveau du HTGI et entraîner de graves effets indésirables (EI) [51]. Cette libération est influencée par le niveau de revêtement, et la libération de médicament peut être déclenchée par un changement de pH, une modification de la pression osmotique ou la perturbation de l'enrobage par un gonflement du noyau. Ces inconvénients procurent aux systèmes dépendants du temps **un manque de spécificité** et empêchent d'aboutir à une validation de ces derniers comme systèmes de libération spécifique au niveau du côlon [52].

Le système Chronotopic TM [53] ou Pulsincap TM [54] (Scherer DDS Ltd, Clydebank, UK) utilisent cette stratégie.

Polymères sensibles au pH

Les **différents compartiments** du tractus gastro-intestinal possèdent **différents pH**. Les enrobages composés de polymères sensibles au pH ont été largement utilisés pour cibler la libération au niveau du côlon. Ils sont en particulier basés sur les polyméthacrylates ayant une solubilité entérique [55] mais également les dérivés d'hydroxypropylmethylcellulose [56] ou la gomme laque [57]. Ces polymères sont présentés dans le tableau 1.

Cependant, il existe une importante **variabilité inter- et intra-individuelle** des valeurs de pH au niveau du tractus gastro-intestinal **influencée par la maladie** [58], au cours de la phase aiguë des MICI, le pH colique a révélé être significativement inférieur au pH physiologique mais certaines données sont contradictoires [59]. De plus, il existe une région légèrement acide dans le côlon proximal, en raison de la fermentation de poly- et oligosaccharides en acides gras à chaîne courte, qui pourrait affecter des profils et la reproductibilité de libération du médicament. Les polymères pH dépendants ne représentent donc **pas le meilleur moyen pour obtenir une libération spécifique au niveau du côlon** [4].

Tableau 1 : Polymères entériques utilisés dans les formulations à libération modifiée pour le « colon targeting ». * approprié pour une dispersion aqueuse ; ** disponible en dispersion aqueuse ; * disponible en solution aqueuse [40], [60].**

Polymère entérique	pH optimum pour la dissolution
Polyvinyl acetate phthalate (PVAP) (Coateric®)**	5.0
Cellulose acetate trimellitate (CAT)	5.5
Hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) HP-50 HP-55 and HP-55S	≥5.0 ≥5.5
Hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) *LF Grade *MF Grade *HF Grade	≥5.5 ≥6.0 ≥6.8
Methacrylic acid copolymer, Type C (Eudragit® L100-55*) Methacrylic acid copolymer dispersion (Eudragit® L30D-55**)	≥ 5.5
Methacrylic acid copolymer, Type A (Eudragit® L-100* and Eudragit® L12.5)	≥ 6.0
Cellulose acetate phthalate (CAP) (Aquateric®)**	6.0
Methacrylic acid copolymer, Type B (Eudragit®S-100* and Eudragit® S12.5)	≥ 7.0
Eudragit® FS30D**	≥ 7.0
Shellac (MarCoat 125*** & 125N***)	7.0

Les formulations développées peuvent ne pas être sensibles qu'à un seul paramètre. De nombreuses formes galéniques allient les différentes stratégies décrites ci-dessus.

Polymères sensibles aux enzymes bactériennes de la flore intestinale

Les systèmes basés sur l'activité enzymatique de la flore microbienne sont probablement **les plus spécifiques** pour une libération colique de PA. La flore intestinale possède de multiples **activités enzymatiques** (surtout pour la dégradation de polysaccharides complexes (résidus de fibre alimentaire) qui constituent son substrat principal) inexistantes dans les cellules humaines. **Ils constituent donc une voie d'avenir pour le ciblage colique.**

Cette approche intéressante utilise le potentiel métabolique de la communauté microbienne unique du côlon humain. Ce concept pourrait être divisé en :

- l'utilisation de précurseurs clivés par des enzymes bactériennes dans le côlon (prodrugs ou polymères avec des liaisons azo-aromatiques)
- l'utilisation des outils (revêtements / matrices) sensibles aux enzymes bactériennes du côlon (évitant l'utilisation de précurseurs).

Cette stratégie est basée sur la diversité du microbiote intestinal et sur son activité métabolique.

Parmi les matériaux sensibles à la biodégradation des enzymes du microbiote colique, il y a des polysaccharides naturels d'origines végétales (plantes, algues), animales ou microbiennes, tels que la pectine, l'inuline, le chitosan, le chondroïtine sulfate, le galactomannane ou l'amylose. Ils sont utilisés pour la libération colique de PA grâce à leurs nombreux avantages :

- Leur abondance dans la nature,
- L'absence de digestion par les enzymes digestives humaines,
- La sécurité d'emploi,
- La biocompatibilité,
- Leur utilisation dans le domaine alimentaire.

Les polysaccharides peuvent être associés à d'autres polymères leur permettant de ne pas se solubiliser dans le HTGI [61] ou peuvent être modifiés chimiquement pour moduler leur propriétés de solubilité [62].

Problématique

L'objectif de ce projet est la mise au point de formes pharmaceutiques innovantes simples pouvant parcourir l'estomac, l'intestin (de pH de 1,5 – 7,4), et résister à différentes enzymes digestives humaines sans dommage pour que le PA puisse être libéré

spécifiquement, soit subitement, soit de manière prolongée lorsque ces dernières arrivent dans le côlon ascendant. Outre de larges perspectives d'application dans le domaine des anti-inflammatoires, cette technologie pourrait concerner de nombreuses autres molécules d'intérêts thérapeutiques citées précédemment (analgésique ou PA peptidiques). La forme pharmaceutique utilisée est une forme solide (minigranule) comprenant un enrobage sensible aux enzymes bactériennes coliques, qui doit se dégrader spécifiquement dans le côlon et qui doit rester intact jusqu'à ce qu'il arrive à ce niveau du tube digestif. Cet enrobage n'est pas spécifique d'un PA et peut convenir pour l'enrobage de PAs des différentes classes thérapeutiques et assurer une libération du PA quel que soit le pH présent dans le côlon.

4. La libération soutenue, d'ordre zéro, des principes actifs

b) Définition

La libération soutenue est avant tout une libération prolongée du PA. Un système ou une formulation galénique ayant une libération du PA d'ordre zéro correspond à une libération à vitesse constante.

Les premières formulations à libération soutenue ont été introduites par Smith Kline and French laboratories en 1952 avec une libération de Dextroamphétamine de 12 heures.

La modulation de la libération des médicaments hydrosolubles peut être régie par différents mécanismes:

- Par modulation du mécanisme de diffusion du milieu de dissolution dans la forme galénique.
 - o Diminution de la diffusion en utilisant des matrices et systèmes de réservoir
 - o Réduire la surface de contact (évite le phénomène de désintégration)
- En contrôlant la diffusion du PA solubilisé à partir de la forme galénique vers le milieu de dissolution.
 - o Diminution de la libération du PA à partir de complexe en utilisant un « environnement concurrentiel » tel que des résines échangeuses d'ions.
 - o L'augmentation de l'épaisseur des couches enrobant la forme solide (système de gonflement).
 - o Diminution de la concentration de PA dans les couches de la forme galénique.
 - o Modification de la sortie du milieu de dissolution de la forme galénique en modifiant la loi naturelle de diffusion (par système osmotique).

- En réduisant la solubilité du PA dans la forme galénique (modification de la forme chimique).
- En diminuant la solubilité des molécules du PA
 - Formulation simultanée du PA et de polymères.
 - Modification chimique du PA.
 - Rendre le PA lipophile (dispersion solide dans de la cire, extrusion à l'état fondu à chaud).
 - Formation de sels acides ou basiques.

Les différentes formes galéniques permettant une libération prolongée sont :

- Les formes matricielles ou réservoirs consistant en un noyau de PA entouré par une membrane polymérique et dont la libération du PA est régie par la première loi de diffusion de Fick.
- Les systèmes de libération osmotiques qui sont des systèmes de choix pour une libération soutenue d'ordre zéro.
- Les comprimés à double noyau ou comprimé multicouche dont le taux de libération du PA dépend de plusieurs facteurs tels que l'épaisseur et la porosité de l'enveloppe extérieure, les types de matériaux utilisés pour comprimer le noyau intérieur et de l'enveloppe extérieure, la taille des particules de l'excipient, la force de compression utilisée pour compresser les deux couches et la position de l'intérieur dans le noyau comprimé.
- La dispersion solide consistant en une dispersion d'un PA dans un support qui contrôle le retard de solubilisation du PA par des phénomènes d'érosion par exemple.
- Les résines échangeuses d'ions qui permettent une libération du PA dépendant de la force ionique et du pH du site d'administration.
- Les systèmes de formation in situ dont le principe est : une solution aqueuse de polymère contenant le PA sous forme dispersée ou dissoute, forme un gel en contact avec le fluide biologique soit dû à un changement de pH ou une interaction ionique.
- Les systèmes multiparticulaires : les minigranules peuvent être enrobées de polymères limitant la vitesse ou compressées en comprimés pour obtenir une libération lente, une libération ciblée ou des profils de libération contrôlée.
- L'extrusion en fusion consistant en un mélange de PA avec des cires ou des polymères retardant sa solubilisation.

c) Les domaines d'application

Les PAs n'ont pas tous un intérêt à être libéré de façon prolongée :

- Les molécules avec un temps de demi-vie plasmatique supérieur à 8h n'ont aucun intérêt à être incorporées dans une forme à libération prolongée car elles sont présentes dans l'organisme durant une période suffisante pour entraîner naturellement une action prolongée ;
- Les PA faiblement solubles dans l'eau. Une faible solubilité freine le processus de dissolution, et par conséquent, l'absorption du PA ;
- Les molécules présentant un premier passage hépatique saturable verront leur biodisponibilité diminuer ;
- Les PA dont la stabilité est fortement dépendante du pH, des réactions enzymatiques et de la flore microbienne ;
- Les PA nécessitant un dosage important sont considérés comme de mauvais candidats pour la libération prolongée;
- Lorsqu'il n'existe pas de relation entre la concentration plasmatique en PA et son effet thérapeutique [63] ;

Inversement, un PA approprié pour une administration orale à libération prolongée doit produire son effet thérapeutique à une dose assez faible pour être avalé, être efficacement absorbé tout le tractus gastro-intestinal, et idéalement, avoir une demi-vie d'élimination qui ne soit pas trop importante (inférieure à 12 heures).

Ces technologies ont permis de développer de nombreuses formes galéniques par voie orale à administration d'une ou deux fois par jour (permettant ainsi d'éviter les pics plasmatiques). Une libération prolongée est beaucoup plus pratique pour le patient et favorise une meilleure observance aux traitements et peut également réduire les effets secondaires indésirables. Cette stratégie de libération continue du principe actif est préférée pour la libération des principes actifs à marge thérapeutique étroite.

Les systèmes avec une cinétique de libération d'ordre zéro semblent supérieurs parce qu'ils maintiennent une concentration stable de médicament dans le sang.

d) Intérêts

Le taux de libération du médicament peut changer en fonction des liaisons entre le PA et le polymère (par exemple, ester, amide, uréthane et), la formulation (par exemple : poudre, hydrogel, enrobage, microsphère), et la composition chimique du polymère (par exemple, squelette non bioactif ou molécule liante). Grâce à des modifications chimiques simples, le taux de libération du PA peut potentiellement être affiné de quelques jours à plusieurs mois, en fonction de l'application souhaitée et nécessaire [64], [65].

e) Technologies

Les systèmes multiparticulaires

Les formes galéniques étudiées sont des systèmes réservoirs (des minigranules) enrobés. Ces petites formes posologiques multiparticulaires présentent des avantages:

- Eviter l'effet tout ou rien lors des éventuelles ruptures des formes galéniques.
- Le temps de vidange gastrique est moins variable. En effet, le pyllore peut être traversé même à l'état nourri.
- La posologie est mieux répartie dans le contenu gastrique.
- La stagnation au niveau iléo-caecal est moins probable qu'avec les formes unitaires.
- La surface de contact avec les enzymes digestives et bactériennes est plus importante.
- Un transit ralenti des petites particules au niveau colique permettant un contact prolongé avec les enzymes bactériennes présentes dans le compartiment colique.
- Enfin, les formulations enrobées peuvent contenir d'avantage de PA que les formes matricielles où le PA est distribué à travers la matrice.

Les polymères

Différents types de polymères sont disponibles dans le commerce pour la préparation de film d'enrobage pour une libération contrôlée, tels que l'éthylcellulose, des dérivés de poly(acrylique) acide, et de poly(vinyl)pyrrolidone. Ils peuvent être appliqués à partir de solutions organiques ou de dispersions aqueuses.

L'éthylcellulose est un matériau d'enrobage particulièrement approprié, car il s'adapte bien à la formation d'un film et est généralement considéré comme non toxique, non allergène et non irritant. Pour adapter la cinétique de libération de PA à partir de formulation enrobées d'éthylcellulose et pour optimiser la stabilité à long terme (en particulier pendant le stockage ouvert à long terme dans des conditions de stress), l'ajout de petites quantités de copolymère PVA-PEG à la dispersion d'éthylcellulose aqueux (Aquacoat ECD) a récemment été proposé.

Une fois que les minigranules entrent en contact avec les fluides corporels aqueux, l'eau pénètre dans les systèmes et dissout le PA incorporé. Ce dernier diffuse ensuite en dehors des formulations, la vitesse de libération étant dirigée par la composition et l'épaisseur de la couche de film [66].

Un autre polymère utilisé est le Kollicoat SR 30D qui consiste en une suspension de 30% de poly(vinyl)pyrrolidone. Les applications des enrobages de Kollicoat® SR 30D compris entre 1 et 5 mg / cm² sont des enrobages à libération prolongée de plusieurs formes de formulation en fonction de la solubilité du PA et de la vitesse de libération ciblées. Le mécanisme de libération des minigranules enrobées de Kollicoat SR 30D est principalement la diffusion et parfois la formation de fissures à la suite de la pénétration de l'eau et de l'accumulation de la pression osmotique, en particulier dans le cas des noyaux de sucre.

Un mélange d'Eudragit® (un polymère acrylique) peut entraîner une libération d'ordre zéro mais ralentit fortement la libération qui atteint seulement 60% en 8 heures [67].

Les techniques d'enrobage

Diverses techniques d'enrobage existent telles que la pulvérisation, la double compression, l'immersion et la formation de couches de poudres et elles sont utilisées selon le type de matières concernées et les caractéristiques souhaitées pour la l'enrobage final. Cependant, l'enrobage par pulvérisation (Figure 5), c'est-à-dire le processus par lequel un substrat solide est recouvert d'une mince couche de polymère déposé à partir d'une suspension ou d'une solution nébulisée reste la technique de référence, ceci en raison de son caractère avantageux en termes de temps, de coûts et d'évolutivité du processus, d'homogénéité de l'épaisseur, de la structure et de la surface de la couche, de la fine modulation du niveau d'enrobage et de la polyvalence en ce qui concerne le type et les dimensions des noyaux de départ [68]. Différentes techniques de pulvérisation (pulvérisation inférieure, supérieure, de type Wurster ou de côté avec un anneau rotatif) existent et présentent chacune leurs avantages (poids limite de chargement de l'appareil ou homogénéité des formes solides à enrober et de l'enrobage) (Figure 6). L'enrobage peut se faire par pulvérisation d'une solution contenant ou non du PA (« drug coating ») ou d'un poudre (pelliculage à sec). Il existe encore d'autres méthodes telles que l'enrobage à haute température avec des excipients lipidiques [69].

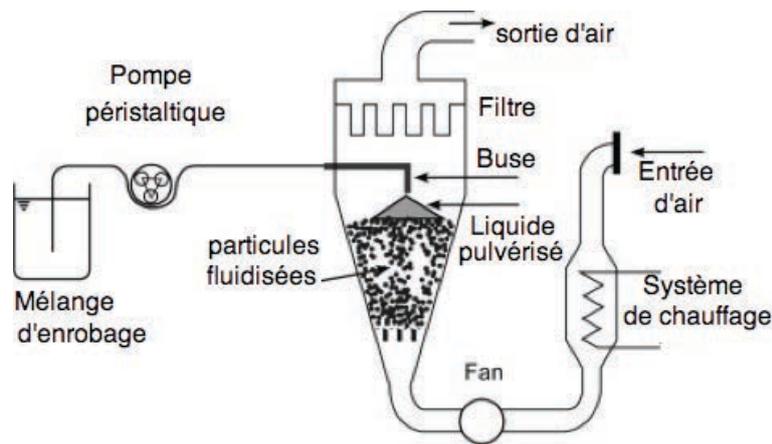


Figure 5 : Représentation schématique d'un enrobage par pulvérisation sur lit d'air fluidisé [70] [71].

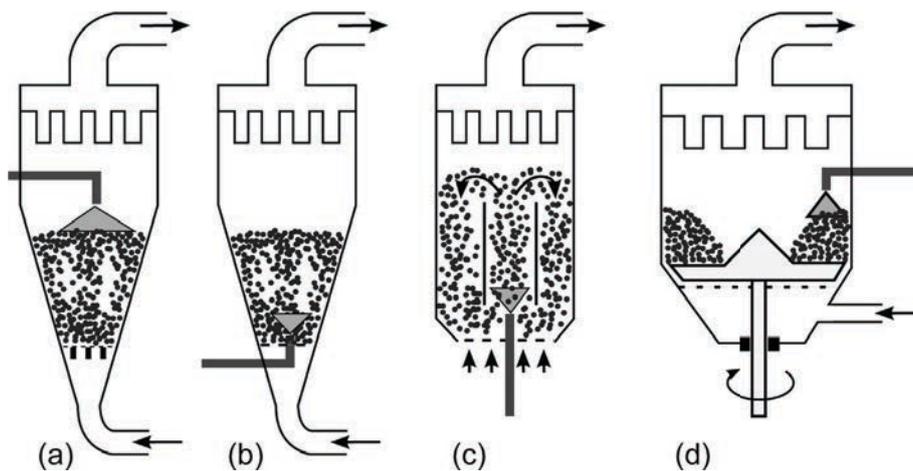


Figure 6: Différentes formes d'enrobage en lit d'air fluidisé: (a) pulvérisation supérieure, (b) de pulvérisation inférieure, (c) le type "Wurster", (d) pulvérisation de côté avec un disque rotatif [70], [71].

Formations des films

Les films polymères sont appliqués à des formes solides à usage décoratif, de protection ou fonctionnel. Le mécanisme de formation des films dépend du fait que le polymère est à l'état dissout ou dispersé. Pour les solutions, la formation du film se produit lors de l'évaporation de solvants, lorsque les chaînes de polymère sont intimement liées. La formation du film à partir de dispersions nécessite la coalescence de sphères isolées de polymère et l'interpénétration des chaînes de polymère [72], [73]. Les films préparés à partir de dispersions polymères nécessitent des conditions thermiques de formation du film. Ces systèmes nécessitent généralement un stockage dans un environnement à température et humidité contrôlées pour assurer la coalescence complète de polymère. La coalescence incomplète peut conduire à des changements significatifs dans la libération du médicament dans le temps [74]–[76].

Les techniques d'analyses des formulations

Un certain nombre d'études utilisant l'analyse mécanique, telles que les essais de libération de PA *in vitro*, ont été utilisées pour comprendre les structures d'enrobage, leurs effets sur la libération du PA et les mécanismes de libération [77], [78]. Des informations sur l'épaisseur de l'enrobage, l'uniformité et la morphologie peuvent être obtenues avec des techniques analytiques [79] comme la microscopie électronique à balayage (MEB) [80], la microscopie à fluorescence [81], la microscopie à force atomique (MFA) [82], la micro-imagerie confocale Raman [82], [83], l'imagerie à dispersion d'énergie des rayons X (EDX) [84], la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) [85], la spectroscopie électronique para-résonance magnétique (EPR) [86], et la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) [87].

Problématique

L'objectif de ce projet est la mise au point d'une forme pharmaceutique innovante simple composée d'un PA fortement soluble et dont la libération est constante durant 8h. Le procédé de fabrication doit rester le plus simple possible afin de pouvoir le transposer industriellement.

II. Les Maladies Inflammatoires chroniques de l'intestin

1) Définition

Les MICI furent décrites entre 1930 et 1950 et regroupent principalement **la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH)** qui se caractérisent par l'inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif (liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif), source de lésions destructrices (ulcérations).

Différentes classifications de ces pathologies existent.

La MC peut être classifiée selon :

- le phénotype (ancienne classification de Rome ou de Vienne et aujourd'hui classification de Montréal [88]) révèle la criticité phénotypique telle que la gravité des lésions.
- l'activité de la maladie : le score CDAI (Crohn's disease activity index) [89]–[91] exposant les accès de crise inflammatoire ou les périodes de rémission.
- la réponse au traitement (cortico-résistant ou cortico-dépendant)
- les facteurs immunologiques (présence ou non des ASCA - Anticorps Anti-*Saccharomyces cerevisiae* qui est une levure alimentaire et ANCA - Anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles [92]). Ces facteurs sont des marqueurs sérologiques diagnostiques des MICI (bien que leur utilité diagnostique et pronostique reste controversée). La raison de leur présence chez les patients atteints de MICI reste inconnue.

La RCH peut être classée selon :

- l'étendue des lésions
- la sévérité des lésions
- l'âge d'apparition des lésions ou la présence d'une cholangite sclérosante primitive concomitante.

Elles se caractérisent par des **phases d'activité d'intensité variable** (appelées "poussées"), alternant avec **des périodes de rémission**. La RCH et la MC n'augmentent pas la mortalité, mais en raison de leur survenue précoce dans la vie et de leur chronicité, elles induisent une morbidité élevée qui altère la qualité de vie des malades.

2) Epidémiologie

Les MICI sont un problème de santé publique dans les pays industrialisés. Elles touchent plus d'un habitant sur 1000 (surtout les jeunes adultes). **L'incidence s'est accrue fortement après la seconde guerre mondiale dans les pays occidentaux** où elle est maintenant stabilisée [93]. Elles sont par contre **en nette augmentation dans les pays en**

voie de développement [94]. Le nombre de malades est estimé en Europe à **1 million de patients ayant une MC et 1,5 millions une RCH dont près de 200 000 en France** [95]. Il existe, depuis 1988, le registre EPIMAD qui couvre 4 départements français : le Nord, le Pas-de-Calais, la Somme et la Seine-Maritime regroupant près de 6 millions d'habitants (9,3% de la population française). Ce registre a permis de conclure que pendant une période de 1988 à 2008, l'incidence de la MC a augmenté de 30% (100% chez l'adolescent et l'adulte jeune) alors que celle de la RCH est restée stable.

3) Signes cliniques

La MC est **une maladie inflammatoire** pouvant atteindre n'importe quel segment du tube digestif depuis la bouche jusqu'à l'anus et pouvant intéresser simultanément ou successivement, un ou plusieurs segments. Cependant **elle siège le plus souvent sur le gros intestin ou côlon**, sur la partie terminale de l'intestin grêle ou iléon ou sur les 2 segments. Elle a été décrite pour la première fois en 1932 par un médecin américain: Burril B Crohn. Selon le consensus européen de l'ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) [96], les signes cliniques sont des diarrhées récurrentes (durée > 6 mois), des douleurs abdominales et/ou une perte de poids. Il existe également des symptômes systémiques tels que des malaises, une anorexie et une fièvre.

La RCH est une **maladie inflammatoire** intestinale atteignant **le rectum** et pouvant « remonter » sur le côlon sans laisser d'intervalle de muqueuse saine. Les autres segments du tube digestif ne sont jamais concernés par l'inflammation. Lors des phases d'activité, l'inflammation atteint la muqueuse, la partie interne de la paroi intestinale. Selon l'extension des lésions au niveau du côlon, on distingue trois types de RCH : les RCH distales (60%) (rectite et recto-sigmoïdite) ; les RCH pancoliques (15%) atteignant le rectum et la totalité du côlon ; et les formes intermédiaires (25%). Selon le consensus européen de l'ECCO [97], les signes cliniques sont des douleurs rectales avec ou sans diarrhée, rectorragie, syndrome dysentérique, ténésme, épreintes et des défécations nocturnes. En cas de forte poussée, des douleurs abdominales et des signes généraux (fièvre, altération de l'état général, anorexie) peuvent être observés. Chez l'enfant et l'adolescent une cassure des courbes staturo-pondérales et/ou un retard pubertaire sont parfois notés.

4) Etiologie

Les MICI sont des **maladies multifactorielles complexes** survenant chez les **individus génétiquement prédisposés**.

Épithélium intestinal, système immunitaire et inflammation

Le développement des MICI peut résulter d'une **anomalie de l'épithélium intestinal** qui devient plus perméable aux macromolécules et même aux bactéries ou aux fragments bactériens de la flore luminale. Les patients possèdent également des **mécanismes immunitaires innés** de la couche épithéliale **défaillants**. Enfin, la reconnaissance de l'antigène et son traitement par les cellules présentatrices d'antigènes sont perturbés et activent les lymphocytes T effecteurs. Ainsi, **une réponse inappropriée du système immunitaire muqueux défectueux** à la flore indigène et à d'autres antigènes de la lumière du tube digestif se développe entraînant une inflammation et une reconstruction cellulaire inappropriée créant les lésions typiques des MICI [98].

Génétique

Les études chez les jumeaux et l'existence de formes familiales de MICI ont souligné l'importance des facteurs de risque génétiques. L'activation du système immunitaire inné par des composants bactériens est médiée par des récepteurs spécifiques, pour lesquels il existe un polymorphisme génétique (par exemple avec NOD2). En 2004, deux nouveaux gènes de prédisposition à la MC ont été décrits : OCTN, un transporteur de cations organiques (notamment de carnitine) exprimé dans les lymphocytes T, les macrophages et les cellules épithéliales et DLG5, qui jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale [99], [100].

En 2001, un premier gène de prédisposition à la MC, appelé **NOD2** puis rebaptisé **CARD15**, a été découvert [101]–[103]. Ce gène code pour une protéine NOD2/CARD15 qui est exprimée de manière constitutive dans les cellules myéloïdes telles que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques et dans un sous-type de cellules épithéliales situées à la base des cryptes appelées cellules de Paneth. La fonction de ces cellules est restée une énigme jusqu'à ce que l'on réalise qu'elles sont essentielles dans la défense innée de la muqueuse intestinale en tant que régulateurs de la densité microbienne de l'intestin grêle. Le mode d'action exact de la protéine NOD2/CARD15 est encore controversé, mais il semblerait qu'elle assure une régulation à la fois positive et négative de la voie de signalisation du récepteur de type Toll (TLR : Toll like receptor). La protéine NOD2/CARD15, contrairement aux TLR qui sont des récepteurs transmembranaires, est un récepteur intracellulaire qui reconnaît la partie élémentaire de toute paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide (MDP), après invasion de la bactérie dans la cellule. L'activation de cette protéine aboutit à l'activation du NFκB qui est un facteur majeur de transcription nucléaire à l'origine de la réponse inflammatoire. Elle joue donc un rôle fondamental dans la reconnaissance bactérienne et la

défense immunitaire innée [104]. Trois mutations de ce gène ont été retrouvées chez les patients atteints de MC. Les mutations de ce gène ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour le développement d'une MC mais ces mutations altèrent la protéine codée par ce gène.

Plusieurs mutations génétiques des acteurs de la machinerie autophagique ont également été impliquées dans la pathogénie des MICI. L'autophagie est génétiquement déterminée par les gènes : NOD2, ATG16L1 et IRGM [105]. L'autophagie est un processus indispensable dans la cellule permettant la dégradation non sélective de macromolécules, d'organites cellulaires et de micro-organismes pathogènes. Une diminution du flux autophagique chez les patients atteints de MICI pourrait expliquer l'expansion de bactéries pro-inflammatoires dans l'intestin des malades. Certaines bactéries sont capables de stimuler l'autophagie et permettent donc une amélioration de la symptomatologie des MICI.

D'autres gènes ont été localisés et leur identification devrait permettre de progresser dans la compréhension des interactions entre l'environnement et le système immunitaire intestinal à l'origine des MICI [94].

Les différents variants génétiques découverts et fortement associés à la MC confortent l'hypothèse que les MICI résulteraient d'une **réponse immunitaire inadaptée au microbiote intestinal** et en particulier aux bactéries invasives chez un **hôte génétiquement prédisposé** [95] et/ou aggravée par des facteurs environnementaux.

Environnement

Les variations épidémiologiques des MICI observées dans le temps et dans l'espace suggèrent l'intervention de facteurs de risque environnementaux mais seul le rôle du tabac et de l'appendicectomie est établi.

Différents éléments environnementaux en lien avec les facteurs génétiques de prédisposition pourraient entraîner le développement d'une MICI en modifiant la composition de la flore intestinale (Tableau 2). Ces éléments sont **les antibiothérapies, les antécédents infectieux périnataux ou de la jeune enfance, les vaccinations** au BCG ou ROR (Rougeole, Oreillons, Rubéole) ou encore l'infection par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* [93], *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* ou *Escherichia coli* adhérents invasif (AIEC) [106]. **Des facteurs alimentaires** tels que la consommation de sucres, de graisses, de protéines ainsi que la présence de microparticules d'oxyde de Titane et de silicate d'aluminium dans les aliments ou l'allaitement maternel ont été étudiés. **La prise de**

contraceptifs oraux a également été soupçonnée pour son impact sur l'augmentation ou la diminution du risque de MICI. Peu de conclusions peuvent être tirées de ces études à cause des biais méthodologiques et des résultats contradictoires [107]. L'hypothèse du rôle de l'infection ou de la vaccination au virus de la rougeole dans le développement des MICI est infirmée à ce jour [108]. **Le stress, le niveau socio-économique ou l'activité physique** sont des facteurs en cours d'étude mais aucune confirmation n'existe.

Tableau 2 : Eléments du mode de vie susceptibles d'agir sur le microbiote intestinal [109].

Eléments du mode de vie moderne susceptibles d'agir sur le microbiote intestinal.
Amélioration de l'état sanitaire
Diminution des maladies parasitaires endémiques
Sols durs des habitations (moins de contact avec les bactéries de la terre)
Diminution de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>
Augmentation de l'utilisation des antibiotiques
Vaccinations
Diminution de la taille des familles
Moins de promiscuité dans les conditions de vie
Chaine du froid
Exposition retardée dans la vie aux infections
Vie sédentaire et obésité
Moins de consommation de nourritures fermentées
Plus de consommations de sucres raffinés, graisses saturées et conservateurs alimentaires
Pollution industrielle : métaux lourds, aluminium, microparticules.

5) Diagnostic

Le diagnostic est habituellement **établi en période de poussée**. Les poussées peuvent débuter à tout âge de la vie mais se révèlent en moyenne entre 20 et 30 ans. 15% des MICI concernent des cas pédiatriques. Le diagnostic est **confirmé par une évaluation clinique combinée** : arguments anamnestiques (interrogatoire du patient), cliniques, endoscopiques et histologiques. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun marqueur permettant d'affirmer avec certitude le diagnostic de l'une ou de l'autre maladie. Différentes **techniques d'imageries** permettent de localiser les lésions : l'échographie abdominale [110], la tomodensitométrie ou l'IRM (imagerie par résonance magnétique).

L'utilisation de **marqueurs biologiques à visée diagnostique ou pronostique** constitue une avancée importante pour la prise en charge des patients. Ils peuvent orienter vers une prise en charge plus précoce avec des moyens peu invasifs. La CRP (protéine C réactive) serait un facteur pronostique d'une inflammation chronique et prédictif de poussées.

Certains marqueurs sériques pourraient aussi être utilisés. Les ASCA (anticorps sériques dirigés contre une levure alimentaire *Saccharomyces cerevisiae*) et les ANCA (anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles) sont deux anticorps présents chez les patients atteints de MICI. La raison de leur existence au cours de ces pathologies est encore inconnue. Leur utilisation comme outils diagnostique ou pronostique de l'évolution des MICI est discutée, cependant, leur sensibilité et spécificité sont actuellement insuffisantes pour les utiliser de façon isolée chez tous les patients. [92]. Aussi, la présence de *Clostridium difficile* producteur de toxines doit être recherchée, notamment par PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne de la Polymérase) car l'infection par cette bactérie requiert une antibiothérapie spécifique.

6) Traitements

Il n'existe **pas de traitement médical curatif** des MICI, mais les traitements actuels obtiennent de plus en plus souvent, de façon suspensive, un contrôle durable de la maladie, une qualité de vie satisfaisante, une diminution de l'intensité et de la durée des poussées et une prévention des récives [111]. La stratégie thérapeutique associe des **traitements symptomatiques, des anti-inflammatoires, des immunosuppresseurs et la chirurgie** (encore nécessaire chez près de 3 patients sur 4 pour la MC). On assiste aujourd'hui à une explosion de biothérapies puissantes ciblées sur des molécules clés de la réponse immunitaire muqueuse intestinale.

a) Traitements médicamenteux

Les traitements médicamenteux comprennent :

Les anti-inflammatoires

Le **traitement de référence** des formes actives modérées de la MC iléo-caecale d'après le consensus européen de l'ECCO [112] est le **budésonide 9 mg par jour**. Les formes coliques de la maladie peuvent être traitées par **sulfasalazine**.

Les aminosalicylates

La sulfasalazine 3 à 6 g/j est efficace pour les formes coliques de la maladie. La sulfasalazine est un anti-inflammatoire intestinal administré par voie orale et dont la libération est ciblée au niveau du côlon grâce à des ponts azoïques clivés par les enzymes de la microflore colique et libérant la molécule active : l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA ou mésalazine). *Asacol*® et *Pentasa*® sont deux spécialités composées de 5-ASA comme principe actif. L'*Asacol*® ou *Fivasa*® (nom commercial français) est un comprimé enrobé par

une résine de type acrylique (Eudragit®), gastrorésistant et libérant le PA à pH>7 (7,2). Le Pentasa® est une formulation à libération temps-dépendant consistant en un comprimé formé de granules composés d'ethylcellulose et de Povidone. *Asacol®* et *Pentasa®* ont prouvé leur efficacité pour les formes iléales et coliques de la maladie, ainsi, le **5-ASA à 3 à 4 g/j pendant 4 à 6 semaines lors d'une poussée** puis à une posologie de **2 g par jour en traitement d'entretien**, est devenu le **traitement le plus utilisé** avec une toxicité limitée bien que de récentes études débâtent la significativité de la supériorité du 5-ASA versus placebo. Les EI les plus fréquents du 5-ASA sont des **maux de tête, des nausées, des douleurs épigastriques et des diarrhées** et sont **liés à la dose**. Les dérivés du 5-ASA existent aussi en forme lavement ou suppositoire pour les localisations anorectales.

Les corticostéroïdes

À l'heure actuelle, le budésônide (*Entocort®*) est préconisé de préférence à la prednisolone si la distribution de la maladie est appropriée. Les avis sont partagés quant à savoir si la prednisolone doit être utilisée pour une maladie active ou réservée aux occasions lorsque le traitement moins toxique a échoué. Les schémas sont différents selon les centres et les patients. **Certains patients sont non répondeurs à la corticothérapie**. Les corticostéroïdes sont efficaces pour induire une rémission mais sont totalement inutiles pour le maintien de celle-ci. Une alternative thérapeutique doit être prévue pour prévenir ces récurrences. Leurs EI comprennent des effets cosmétiques (acné, pâleur, œdème), des troubles du sommeil et de l'humeur, une dyspepsie, ou une intolérance au glucose. Les effets associés à une utilisation prolongée sont la cataracte, l'ostéoporose, une myopathie, et une susceptibilité à l'infection. Toutefois, le budésônide cause moins de réduction de la densité minérale osseuse que la prednisolone. La prednisone (*Cortancyl®*) ou la prednisolone (*Solupred®*) à la dose de 0,75 à 1 mg/kg/j permettent l'obtention d'une rémission clinique entre 3 à 7 semaines dans 90 % des cas. Le budésônide est utilisé à la dose de 3 gélules (*Entocort®* 3mg en gélule) par jour pendant 4 à 8 semaines.

Le traitement des crises de RCH avec des signes de toxicité systémique sont des corticoïdes injectables : méthylprednisolone (*Solumedrol®*) 60 mg ou hydrocortisone (*Hydrocortisone®*) 400 mg /jour. La ciclosporine (*Néoral®, Sandimmun®*) peut être utilisée chez les personnes intolérantes aux corticoïdes.

Les antimétabolites : Thiopurines et Méthotrexate

Ce sont les immunodépresseurs conventionnels, traitements de fond de première intention de toutes les MC non bénignes et des RCH évolutives non contrôlées par les dérivés 5 – aminosalicyclés. Les thiopurines : Azathioprine ou AZA (*Imurel*®) et 6-Mercaptopurine ou 6-MP (*Purinethol*®), à la posologie de 2 à 2,5 mg/kg/jour sont **efficaces dans 60 à 70 % des formes corticodépendantes ou corticorésistantes** de MC et leur délai moyen d'action est de 3 à 6 mois. Le Méthotrexate peut être utilisé comme alternative si les thiopurines ne sont pas tolérées, mais ce traitement possède des contre-indications particulières telles que la grossesse. Les antimétabolites sont utilisés comme traitement **adjuvant des corticoïdes**. Ils sont considérés comme des agents épargneurs de corticoïdes. Leurs EI sont pour la thiopurine des réactions pseudo-grippales et une éventuelle leucopénie ; pour le méthotrexate, une toxicité gastrique avec nausées, vomissement, diarrhées et stomatites. Les médicaments dont la co-prescription majeure la toxicité hématologique du méthotrexate sont les pénicillines, l'aspirine, les AINS et la triméthoprimine. L'utilisation de ces immunosuppresseurs doit être assortie d'une surveillance biologique stricte et de précautions d'utilisation vis-à-vis des infections et des cancers.

Les biothérapies :

Infliximab

Le Rémicade® est un anticorps monoclonal chimérique humain/souris qui se lie avec une grande affinité à la fois aux formes soluble et transmembranaire du TNF-alpha. L' ECCO est unanime pour affirmer que l'Infliximab (une perfusion IV de 5 mg/ kg ou 3 perfusions de 5 mg/kg en 6 semaines pour les MC fistulisées) est approprié pour les **MC dépendantes aux corticoïdes, réfractaires à la corticothérapie ou chez les patients intolérants aux corticoïdes** [113]. Tous les patients traités par Infliximab doivent recevoir un traitement immunomodulateur (AZA, 6-MP ou Methotrexate), sauf si celui-ci ne peut être toléré. En effet, les immunomodulateurs réduisent le développement d'anticorps anti-Infliximab qui réduisent l'efficacité et augmentent les effets secondaires de l'Infliximab. L'infliximab augmente le risque infectieux, ainsi il multiplie par quatre ou cinq le risque de tuberculose. L'instauration d'un tel traitement est associé à une radiographie des poumons et parfois à la mise en place d'une trithérapie contre la tuberculose ou d'un test de réaction à la tuberculine pour dépister la tuberculose. Avant la mise en place de ce traitement, la présence d'un abcès ou d'un syndrome obstructif doit être exclue. Les EI sont des éventuelles réactions à la perfusion (pendant ou dans les 2h après la perfusion) pouvant être traitées par des

antihistaminiques, du paracétamol, et parfois des corticostéroïdes. Des réactions anaphylactiques ont été décrites. Une réaction tardive de douleur et de raideur articulaires, avec fièvre, myalgies et malaise peut se produire, surtout s'il y a eu un intervalle de plus d'un an avec une perfusion précédente. Un pré-traitement par hydrocortisone est conseillé dans ces circonstances. L'infection est la principale contre-indication.

Adalimumab

L'Humira® est **une alternative** pour les patients adultes qui n'ont pas répondu malgré un traitement approprié et bien conduit par un corticoïde et/ou un immunosuppresseur ou chez lesquels ce traitement est contre-indiqué ou mal toléré. Il est également prescrit chez les patients adultes atteints de RCH active, modérée à sévère ayant eu une réponse inadéquate au traitement conventionnel, comprenant les corticoïdes et la 6-MP ou l'AZA, ou chez lesquels ce traitement est contre-indiqué ou mal toléré. Cette biothérapie est un anticorps monoclonal anti-TNF entièrement humanisé. L'Adalimumab est administré en **sous-cutané** donc est moins immunogène. Le schéma posologique classique est une phase d'induction consistant en une injection de 80 mg la semaine 0 (ou 160 pour la RCH ou si une réponse rapide est souhaitée) suivie d'une injection de 40 mg la semaine 2 (80 mg pour la RCH). Après la phase d'induction, la posologie recommandée est de 40 mg toutes les 2 semaines (80 mg pour la RCH).

D'autres biothérapies sont en cours d'essais pour ces indications, utilisant des mécanismes d'action différents, telles que le Visilizumab (Anticorps humanisé anti-CD3), l'Alicaforsen (Inhibiteur anti-sens de la RNase de la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM-1), le Daclizumab (anticorps monoclonal humanisé de sous-type IgG1 se liant aux récepteur à l'interleukine 2 (IL2), le Certolizumab (inhibiteur de TNF α), le Natalizumab (anticorps monoclonal humanisé anti-integrin-4), le Fontolizumab (anticorps humanisé anti-Interferon γ) et l'Etanercept (inhibiteur de TNF α).

Les traitements symptomatiques :

Les antalgiques

D'après le guide ALD (Affection Longue Durée) n°24 de l'HAS (Haute Autorité de santé) [114], les antalgiques à utiliser sont ceux de palier 1 ou 2 à l'exception des AINS (Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens) non salicylés et des antispasmodiques.

Les antibiotiques

Les antibiotiques ne sont **pas recommandés** dans la MC modérément active **sans complication septique** [112]. Les antibiotiques sont **réservés** aux patients présentant **une hyperthermie**, ou dont les résultats d'imagerie témoignent de la **présence d'un abcès**. L'association d'antibiotiques utilisée se compose du **métronidazole et de la ciprofloxacine**. Le métronidazole est un anti-infectieux de la famille des nitro-5-imidazolés dont le spectre d'activité antibactérienne touche les bactéries anaérobies et *Helicobacter pylori* (bactérie aérobie à Gram négatif causant des ulcères gastro-duodénaux). Le métronidazole est également une molécule antiparasitaire des parasites affectant le tube digestif tels que *Entamoeba histolytica* et *Giardia intestinalis*. La ciprofloxacine est un antibiotique de la classe des fluoroquinolones habituellement actif sur les bactéries aérobies à Gram négatif. Ainsi, l'association de ces 2 antibiotiques permet de viser un large spectre de micro-organismes pathogènes du tube digestif. Les EI de cette antibiothérapie sont les effets à courts termes dans 50% des cas (nausées, gout métallique, effet antabuse). La polyneuropathie secondaire au métronidazole limite l'utilisation à long terme et l'utilisation de ciprofloxacine à long terme est associée à un risque de tendinite et rupture du tendon d'Achille en particulier avec l'utilisation concomitante des corticostéroïdes.

Les éventuelles infections à *Clostridium difficile* sont traitées par métronidazole (500 mg, 3 fois/j) ou par vancomycine par voie orale (250 à 500 mg, 4 fois/ jour). Il existe également la Fidaxomicine (200 mg, 2 fois/ jour), qui est un antimicrobien macrocyclique inhibant la synthèse de l'ARN par l'ARN polymérase bactérienne. Ce dernier est utilisé en cas de récurrence d'infection à *Clostridium difficile*, sauf dans les cas les plus sévères [115].

Les antidiarrhéiques

Le loperamide est un antidiarrhéique analogue structurel des opiacés. Il a une activité antisécrétoire par augmentation du flux hydro-électrolytique de la lumière intestinale vers le pôle plasmatique de l'entérocyte et réduction du flux inverse. Il permet l'obtention d'effets rapides et durables par un ralentissement du transit colique tout en respectant les caractères bactériologiques et parasitologiques des selles. Il peut être associé à la colestyramine qui est une résine basique synthétique échangeuse d'ions, possédant une forte affinité pour les acides biliaires. Elle fixe les acides biliaires sous forme d'un complexe insoluble, inhibant ainsi leur cycle entérohépatique et augmentant leur élimination fécale.

Lors de colite, une malabsorption des selles biliaires peut être observée. Ainsi, la colestyramine et le loperamide peuvent être associés pour limiter les symptômes diarrhéiques de ces patients.

b) Alimentation artificielle

La nutrition artificielle n'est **pas recommandée dans la MC modérément active**. Elle doit être administrée en complément d'un autre traitement et peut être utile lors de résection qui entraîne le raccourcissement de l'intestin ou pour la prise en charge des sténoses étendues de l'intestin. Elle est considérée par le consensus comme **seule appropriée pour le traitement d'appoint pour soutenir la nutrition** et non pour le traitement primaire. La nutrition parentérale totale est un traitement d'appoint approprié dans les formes complexes avec présence de fistule.

c) Les traitements chirurgicaux

La chirurgie n'est **pas un traitement de première intention**. Les traitements chirurgicaux vont de la chirurgie simple : stomie de dérivation dans les cas des manifestations anopérinéales sévères ; à la plus compliquée : coloproctectomie totale avec anastomose iléo-anale. L'indication opératoire peut être portée en urgence dans le cadre d'une colite aigue grave après échec du traitement médical ou, beaucoup plus rarement, devant une forme compliquée (abcès, péritonite). Les autres indications opératoires portées à froid sont essentiellement des MC mal contrôlées par le traitement médical, avec sténose colique symptomatique ou, en cas de dysplasie, voire de cancer.

Dans les cas de la RCH, le traitement chirurgical est nécessaire : à froid dans les formes résistantes au traitement médical et chez les patients à risque de cancers colorectal ; en urgence, en cas de colite aigue grave compliquée (colectasie, hémorragie, perforation) ou résistante au traitement médical. L'anastomose iléo-anale avec réservoir en J est l'intervention de référence dans les RCH car elle permet d'arriver au double objectif de la guérison de la maladie par ablation de la totalité de la muqueuse potentiellement malade, et de conservation de la fonction sphinctérienne. La laparoscopie en plein essor dans cette indication permet d'améliorer les suites opératoires à court et à long terme. La colectomie peut être recommandée en cas de détérioration clinique.

d) Les règles hygiéno-diététiques

L'arrêt du tabac doit être conseillé au cours de la MC. En cas de dénutrition importante, un régime hyperprotéique voire une nutrition entérale ou parentérale peut être proposée. Lors des poussées, un régime limitant l'apport de fibres (fruits, légumes, céréales) est généralement conseillé afin de ne pas aggraver les symptômes (diarrhée, douleur). L'hydratation est primordiale pour combler les pertes en eau dues aux diarrhées.

Ainsi, le traitement des MICI est avant tout symptomatique et médicamenteux. La libération colique des PAs anti-inflammatoires ou antibiotiques utilisés pour ces traitements améliorerait leur efficacité et diminuerait leurs EI systémiques. C'est pourquoi la recherche sur le ciblage colique est en plein essor dans ces indications.

III. Objectifs du travail

Ce présent travail vise, à travers deux approches différentes, à traiter la libération modifiée des principes actifs, leur intérêt en pratique clinique et leur faisabilité en production industrielle.

Une première difficulté lors de l'élaboration de nouvelles formulations est le développement de tests de libération du PA réalistes, efficaces et reproductibles *in vitro*. Cette problématique est traitée à travers l'approche de la libération colique qui est un enjeu majeur dans le traitement des MICI. Une des démarches possibles est l'utilisation d'enrobages composés de polysaccharides dégradés par les enzymes sécrétées par la microflore colique. Mais l'absence d'une méthode reproductible, simulant les conditions physiologiques du colon et l'impact potentiel des traitements antibiotiques associés qui pourraient affecter la quantité et la qualité des bactéries présentes et des enzymes sécrétées, est un obstacle à la mise au point de telles formulations. L'objectif de l'étude est, dans un premier temps, de dresser un état des lieux des différentes méthodes d'essai de libération du PA, à partir de formulations solides à libération colique sensibles aux enzymes bactériennes, décrites dans la littérature et d'élaborer un test *in vitro* le plus réaliste, efficace et reproductible possible. Ensuite, le but est d'effectuer un screening de polysaccharides ayant un intérêt dans le développement de nouvelles formulations à libération colique. Après cette sélection, la libération des formulations retenues est évaluée par une méthode utilisant des selles de patients atteints de MICI traités ou non par antibiothérapie. Enfin, l'utilisation de mélanges bactériens pour un éventuel remplacement de l'utilisation de selles fraîches est évaluée.

Une seconde difficulté rencontrée lors de la conception de nouvelles formes pharmaceutiques est de répondre aux besoins cliniques tout en élaborant des formulations dont la fabrication peut être transposée à l'échelle industrielle. Cette problématique est traitée à travers une seconde approche consistant en l'élaboration d'une formulation dont la fabrication est la plus simple possible permettant une libération contrôlée, d'ordre zéro, du PA. Les formes orales enrobées présentent un grand potentiel pour la libération contrôlée de PAs et sont réalisables relativement facilement à l'échelle industrielle. Néanmoins, il est difficile d'obtenir une libération à vitesse constante avec ce type de formulation. Ceci est généralement dû au rôle prédominant du transport de masse par diffusion, ce qui entraîne, avec le temps, une diminution de la concentration en PA au cœur du système, donc une réduction du gradient de concentration qui est la force motrice de la libération du PA. Ce type

de cinétique de libération peut être inapproprié pour un traitement médicamenteux sûr et efficace. Malgré l'importance pratique de ce défi crucial de formulation, étonnamment, peu de stratégies efficaces sont connues. Dans cette étude, une nouvelle stratégie, basée sur une succession de couches de PA et de polymères (initialement dépourvu de PA) présentant une distribution initiale de PA non homogène, associée à un effet de temps de latence et à une diffusion partielle initiale à travers le noyau de la minigranule est testée. Des variations de type, de quantité, d'épaisseur et de séquence des couches de PA et de polymères sont réalisées afin d'aboutir à un système le plus simple possible permettant une libération relativement constante durant 8h.

IV. Références

- [1] H. Lennernäs et B. Abrahamsson, « The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 57, no 3, p. 273-285, mars 2005.
- [2] E. Gue, J. F. Willart, S. Muschert, F. Danede, E. Delcourt, M. Descamps, et J. Siepmann, « Accelerated ketoprofen release from polymeric matrices: importance of the homogeneity/heterogeneity of excipient distribution », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 1, p. 298-307, nov. 2013.
- [3] S. Krenzlin, F. Siepmann, D. Wils, L. Guerin-Deremaux, M. P. Flament, et J. Siepmann, « Non-coated multiparticulate matrix systems for colon targeting », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, mars 2011.
- [4] Y. Karrou, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [5] S. Gupta, A. Jain, M. Chakraborty, J. K. Sahni, J. Ali, et S. Dang, « Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments », *Drug Deliv.*, vol. 20, no 6, p. 237-246, août 2013.
- [6] A. Baldi, « Surface Modified Nanoparticulate Carrier Constructs for Oral Mucosal Vaccine Delivery », *Curr. Drug Deliv.*, juill. 2014.
- [7] T. H. H. Thi, « Développement et évaluation de médicaments à usage pédiatrique : masquage de goût du principe actif et fabrication de minigranules à désintégration rapide », Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012.
- [8] D. L. Cooper, C. M. Conder, et S. Harirforoosh, « Nanoparticles in drug delivery: mechanism of action, formulation and clinical application towards reduction in drug-associated nephrotoxicity », *Expert Opin. Drug Deliv.*, p. 1-20, juill. 2014.
- [9] P. H.-L. Tran, T. T.-D. Tran, S. A. Lee, V. H. Nho, S.-C. Chi, et B.-J. Lee, « Roles of MgO release from polyethylene glycol 6000-based solid dispersions on microenvironmental pH, enhanced dissolution and reduced gastrointestinal damage of telmisartan », *Arch. Pharm. Res.*, vol. 34, no 5, p. 747-755, mai 2011.
- [10] R. Tietze, S. Lyer, S. Dürr, T. Struffert, T. Engelhorn, M. Schwarz, E. Eckert, T. Göen, S. Vasylyev, W. Peukert, F. Wiekhorst, L. Trahms, A. Dörfler, et C. Alexiou, « Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles--biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits », *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 9, no 7, p. 961-971, oct. 2013.
- [11] F. Wang, Y. Shen, X. Xu, L. Lv, Y. Li, J. Liu, M. Li, A. Guo, S. Guo, et F. Jin, « Selective tissue distribution and long circulation endowed by paclitaxel loaded PEGylated poly(ϵ -caprolactone-co-L-lactide) micelles leading to improved anti-tumor effects and low systematic toxicity », *Int. J. Pharm.*, vol. 456, no 1, p. 101-112, nov. 2013.
- [12] H. Kathpalia et A. Gupte, « An introduction to fast dissolving oral thin film drug delivery systems: a review », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 10, no 6, p. 667-684, déc. 2013.

- [13] H. Goel, P. Rai, V. Rana, et A. K. Tiwary, « Orally disintegrating systems: innovations in formulation and technology », *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 2, no 3, p. 258-274, 2008.
- [14] S. Joshi et H.-U. Peterleit, « Film coatings for taste masking and moisture protection », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 395-406, déc. 2013.
- [15] T. Yoshida, T. C. Lai, G. S. Kwon, et K. Sako, « pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no 11, p. 1497-1513, août 2013.
- [16] Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, « Monography 01/2014:0478- Comprimés », in *European Pharmacopeia 7.2*, 2011.
- [17] Y. Qiu, « Chapter 20 - Rational Design of Oral Modified-Release Drug Delivery Systems », in *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Y. Q. C. G. Z. Z. L. R. Porter, Éd. San Diego: Academic Press, 2009, p. 469-499.
- [18] Juergen Siepmann et Florence Siepmann, « Time-Controlled Drug Delivery Systems », in *Modern Pharmaceuticals*, vol. Volume 2: Applications and Advances, 0 vol., Informa Healthcare, 2009, p. 1-22.
- [19] Yie W. Chien et Senshang Lin, « Drug Delivery: Controlled Release », in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Third Edition, 0 vol., Informa Healthcare, 2006, p. 1082-1103.
- [20] R. Kinget, W. Kalala, L. Vervoort, et G. van den Mooter, « Colonic drug targeting », *J. Drug Target.*, vol. 6, no 2, p. 129-149, 1998.
- [21] L. Martin-Banderas, J. Alvarez-Fuentes, M. Duran-Lobato, J. Prados, C. Melguizo, M. Fernandez-Arevalo, et M. A. Holgado, « Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 5793-5806, 2012.
- [22] M. Kathania, M. Zadeh, Y. L. Lightfoot, R. M. Roman, B. Sahay, J. R. Abbott, et M. Mohamadzadeh, « Colonic immune stimulation by targeted oral vaccine », *PloS One*, vol. 8, no 1, p. e55143, 2013.
- [23] C. Sandolo, S. Péchiné, A. Le Monnier, S. Hoys, C. Janoir, T. Coviello, F. Alhaique, A. Collignon, E. Fattal, et N. Tsapis, « Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile* », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 79, no 3, p. 566-573, nov. 2011.
- [24] L. Stoeker, S. Nordone, S. Gunderson, L. Zhang, A. Kajikawa, A. LaVoy, M. Miller, T. R. Klaenhammer, et G. A. Dean, « Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector », *Clin. Vaccine Immunol. CVI*, vol. 18, no 11, p. 1834-1844, nov. 2011.
- [25] A. Maroni, L. Zema, M. D. Del Curto, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, no 0.
- [26] A. Maroni, M. D. Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral colon delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 372-394, déc. 2013.
- [27] J. P. Goff, N. J. Koszewski, J. S. Haynes, et R. L. Horst, « Targeted delivery of vitamin D to the colon using β -glucuronides of vitamin D: therapeutic effects in a murine

model of inflammatory bowel disease », *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, nov. 2011.

[28] M. Saffran, G. S. Kumar, C. Savariar, J. C. Burnham, F. Williams, et D. C. Neckers, « A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs », *Science*, vol. 233, no 4768, p. 1081-1084, 1986.

[29] M. Saffran, J. B. Field, J. Peña, R. H. Jones, et Y. Okuda, « Oral insulin in diabetic dogs », *J. Endocrinol.*, vol. 131, no 2, p. 267-278, nov. 1991.

[30] G. Van den Mooter, C. Samyn, et R. Kinget, « Azo polymers for colon-specific drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 87, no 1-3, p. 37-46, nov. 1992.

[31] G. V. den Mooter, C. Samyn, et R. Kinget, « The Relation Between Swelling Properties and Enzymatic Degradation of Azo Polymers Designed for Colon-Specific Drug Delivery », *Pharm. Res.*, vol. 11, no 12, p. 1737-1741, déc. 1994.

[32] G. Van den Mooter, C. Samyn, et R. Kinget, « Characterization of colon-specific azo polymers: A study of the swelling properties and the permeability of isolated polymer films », *Int. J. Pharm.*, vol. 111, no 2, p. 127-136, oct. 1994.

[33] H. Tozaki, T. Fujita, J. Komoike, S.-I. Kim, H. Terashima, S. Muranishi, S. Okabe, et A. Yamamoto, « Colon-specific Delivery of Budesonide with Azopolymer-coated Pellets: Therapeutic Effects of Budesonide with a Novel Dosage Form against 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid-induced Colitis in Rats », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 51, no 3, p. 257-261, mars 1999.

[34] H. Tozaki, J. Nishioka, J. Komoike, N. Okada, T. Fujita, S. Muranishi, S.-I. Kim, H. Terashima, et A. Yamamoto, « Enhanced absorption of insulin and (Asu1,7)eel-calcitonin using novel azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery », *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, no 1, p. 89-97, janv. 2001.

[35] G. V. den Mooter, C. Samyn, et R. Kinget, « *In vivo* Evaluation of a Colon-Specific Drug Delivery System: An Absorption Study of Theophylline from Capsules Coated with Azo Polymers in Rats », *Pharm. Res.*, vol. 12, no 2, p. 244-247, févr. 1995.

[36] H. Chowdary Vadlamudi, Y. Prasanna Raju, B. Rubia Yasmeen, et J. Vulava, « Anatomical, Biochemical and Physiological Considerations of the Colon in Design and Development of Novel Drug Delivery Systems », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 9, no 6, p. 556-565, oct. 2012.

[37] F. Theeuwes, D. R. Swanson, G. Guittard, A. Ayer, et S. Khanna, « Osmotic delivery systems for the beta-adrenoceptor antagonists metoprolol and oxprenolol: design and evaluation of systems for once-daily administration », *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 19 Suppl 2, p. 69S-76S, 1985.

[38] N. S. Barakat, S. A. Al-Suwayeh, E. I. Taha, et A. E. Bakry Yassin, « A new pressure-controlled colon delivery capsule for chronotherapeutic treatment of nocturnal asthma », *J. Drug Target.*, vol. 19, no 5, p. 365-372, juin 2011.

[39] K. Niwa, T. Takaya, T. Morimoto, et K. Takada, « Preparation and evaluation of a time-controlled release capsule made of ethylcellulose for colon delivery of drugs », *J. Drug Target.*, vol. 3, no 2, p. 83-89, 1995.

- [40] B. Singh, « Modified-Release Solid Formulations for Colonic Delivery », *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 1, no 1, p. 53-63, févr. 2007.
- [41] S. Buhmann, C. Kirchoff, R. Ladurner, T. Mussack, M. F. Reiser, et A. Lienemann, « Assessment of colonic transit time using MRI: a feasibility study », *Eur. Radiol.*, vol. 17, no 3, p. 669-674, mars 2007.
- [42] C. Hedsund, T. Gregersen, I. M. Joensson, H. V. Olesen, et K. Krogh, « Gastrointestinal transit times and motility in patients with cystic fibrosis », *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 8-9, no 47, p. 920-926, sept. 2012.
- [43] A. Gazzaniga, M. Cerea, A. Cozzi, A. Foppoli, A. Maroni, et L. Zema, « A Novel Injection-Molded Capsular Device for Oral Pulsatile Delivery Based on Swellable/Erodible Polymers », *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, no 1, p. 295-303, mars 2011.
- [44] L. Zema, G. Loreti, E. Macchi, A. Foppoli, A. Maroni, et A. Gazzaniga, « Injection-molded capsular device for oral pulsatile release: Development of a novel mold », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no 2, p. 489-499, févr. 2013.
- [45] C. M. Cassidy, M. M. Tunney, D. L. Caldwell, G. P. Andrews, et R. F. Donnelly, « Development of Novel Oral Formulations Prepared via Hot Melt Extrusion for Targeted Delivery of Photosensitizer to the Colon », *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, no 4, p. 867-876, 2011.
- [46] A. Gazzaniga, P. Iamartino, G. Maffione, et M. E. Sangalli, « [An oral delayed-action formulation for release in the colon] », *Boll. Chim. Farm.*, vol. 132, no 3, p. 78-80, mars 1993.
- [47] M. Muraoka, Z. Hu, T. Shimokawa, S. Sekino, R. Kurogoshi, Y. Kuboi, Y. Yoshikawa, et K. Takada, « Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 52, no 1-2, p. 119-129, mars 1998.
- [48] Y.-I. Jeong, T. Ohno, Z. Hu, Y. Yoshikawa, N. Shibata, S. Nagata, et K. Takada, « Evaluation of an intestinal pressure-controlled colon delivery capsules prepared by a dipping method », *J. Controlled Release*, vol. 71, no 2, p. 175-182, avr. 2001.
- [49] G. D'haens, D. Hommes, L. Engels, F. Baert, L. Van Der Waaij, P. Connor, J. Ramage, O. Dewit, M. Palmen, D. Stephenson, et R. Joseph, « Once daily MMX mesalazine for the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis: a phase II, dose-ranging study », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 24, no 7, p. 1087-1097, 2006.
- [50] L. C. Kaus, J. T. Fell, H. Sharma, et D. C. Taylor, « Representation of the path of a non-disintegrating capsule in the gastrointestinal tract using external scintigraphy and computer graphics », *Nucl. Med. Commun.*, vol. 7, no 8, p. 587-591, août 1986.
- [51] S. Bondesen, « Intestinal fate of 5-aminosalicylic acid: regional and systemic kinetic studies in relation to inflammatory bowel disease », *Pharmacol. Toxicol.*, vol. 81 Suppl 2, p. 1-28, 1997.
- [52] L. Yang, J. S. Chu, et J. A. Fix, « Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation », *Int. J. Pharm.*, vol. 235, no 1-2, p. 1-15, mars 2002.

- [53] M. E. Sangalli, A. Maroni, C. Buseti, L. Zema, F. Giordano, et A. Gazzaniga, « *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral systems for time and site specific delivery of drugs (Chronotopic technology) », *Boll. Chim. Farm.*, vol. 138, no 3, p. 68-73, mars 1999.
- [54] P. R. Yalavarthi, J. Vulava, H. C. Vadlamudi, R. Y. Balambhaigari, et R. Nair, « Modified pulsincap of ibuprofen--a novel approach for chronotherapy », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 10, no 3, p. 299-308, juin 2013.
- [55] M. Y. Hu et M. A. Peppercorn, « MMX mesalamine: a novel high-dose, once-daily 5-aminosalicylate formulation for the treatment of ulcerative colitis », *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 9, no 6, p. 1049-1058, avr. 2008.
- [56] M. Marvola, P. Nykänen, S. Rautio, N. Isonen, et A.-M. Autere, « Enteric polymers as binders and coating materials in multiple-unit site-specific drug delivery systems », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 7, no 3, p. 259-267, févr. 1999.
- [57] V. R. Sinha et R. Kumria, « Coating polymers for colon specific drug delivery: A comparative *in vitro* evaluation », *Acta Pharm.*, vol. 53, no 1, p. 41-47, 2003.
- [58] J. Fallingborg, L. A. Christensen, B. A. Jacobsen, et S. N. Rasmussen, « Very low intraluminal colonic pH in patients with active ulcerative colitis », *Dig. Dis. Sci.*, vol. 38, no 11, p. 1989-1993, nov. 1993.
- [59] S. G. Nugent, D. Kumar, D. S. Rampton, et D. F. Evans, « Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs », *Gut*, vol. 48, no 4, p. 571-577, avr. 2001.
- [60] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, et P. K. Sharma, « Novel prospective in colon specific drug delivery system », *Polim. Med.*, vol. 44, no 2, p. 109-118, juin 2014.
- [61] Y. Karrouf, C. Neut, D. Wils, F. Siepman, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepman, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [62] M. Beesh et T. Vandamme, *Mise au point de nouvelles formulations pharmaceutiques orales à délivrance ciblée de principes actifs au niveau du côlon. 2009-.....*, France: Université de Strasbourg, 2010.
- [63] K. Park, « Controlled drug delivery systems: Past forward and future back », *J. Controlled Release*.
- [64] N. D. Stebbins, M. A. Ouimet, et K. E. Uhrich, « Antibiotic-containing polymers for localized, sustained drug delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, avr. 2014.
- [65] E. L. Michelson, « Calcium antagonists in cardiology: update on sustained-release drug delivery systems », *Clin. Cardiol.*, vol. 14, no 12, p. 947-950, déc. 1991.
- [66] S. Muschert, F. Siepman, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « Simulated food effects on drug release from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 36, no 2, p. 173-179, févr. 2010.
- [67] K. Nollenberger et J. Albers, « Poly(meth)acrylate-based coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 461-469, déc. 2013.

- [68] A. Maroni, L. Zema, G. Loreti, L. Palugan, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral pulsatile release », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 362-371, déc. 2013.
- [69] V. Jannin et Y. Cuppok, « Hot-melt coating with lipid excipients », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 480-487, déc. 2013.
- [70] E. Teunou et D. Poncelet, « Batch and continuous fluid bed coating – review and state of the art », *J. Food Eng.*, vol. 53, no 4, p. 325-340, août 2002.
- [71] G. Toschkoff et J. G. Khinast, « Mathematical modeling of the coating process », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 407-422, déc. 2013.
- [72] L. A. Felton, « Mechanisms of polymeric film formation », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 423-427, déc. 2013.
- [73] S. Muschert, F. Siepmann, B. Leclercq, et J. Siepmann, « Dynamic and static curing of ethylcellulose:PVA-PEG graft copolymer film coatings », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 78, no 3, p. 455-461, août 2011.
- [74] F. Siepmann, S. Muschert, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepmann, « How to improve the storage stability of aqueous polymeric film coatings », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 126, no 1, p. 26-33, févr. 2008.
- [75] S. Muschert, F. Siepmann, Y. Cuppok, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepmann, « Improved long term stability of aqueous ethylcellulose film coatings: Importance of the type of drug and starter core », *Int. J. Pharm.*, vol. 368, no 1-2, p. 138-145, févr. 2009.
- [76] J. Siepmann et F. Siepmann, « Stability of aqueous polymeric controlled release film coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 437-445, déc. 2013.
- [77] Y. Rosiaux, C. Velghe, S. Muschert, R. Chokshi, B. Leclercq, F. Siepmann, et J. Siepmann, « Mechanisms controlling theophylline release from ethanol-resistant coated pellets », *Pharm. Res.*, vol. 31, no 3, p. 731-741, mars 2014.
- [78] S. Muschert, F. Siepmann, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepmann, « Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 72, no 1, p. 130-137, mai 2009.
- [79] M. Haaser, Y. Karrout, C. Velghe, Y. Cuppok, K. C. Gordon, M. Pepper, J. Siepmann, T. Rades, P. F. Taday, et C. J. Strachan, « Application of terahertz pulsed imaging to analyse film coating characteristics of sustained-release coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 521-526, déc. 2013.
- [80] G. Heinicke et J. B. Schwartz, « Drug release from ammonio-methacrylate-coated diltiazem particles: influence of the reservoir on membrane behavior », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 12, no 5, p. 473-479, 2007.
- [81] M. Andersson, B. Holmquist, J. Lindquist, O. Nilsson, et K. G. Wahlund, « Analysis of film coating thickness and surface area of pharmaceutical pellets using fluorescence microscopy and image analysis », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 22, no 2, p. 325-339, mars 2000.

- [82] A. Ringqvist, L. S. Taylor, K. Ekelund, G. Ragnarsson, S. Engström, et A. Axelsson, « Atomic force microscopy analysis and confocal Raman microimaging of coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 267, no 1-2, p. 35-47, nov. 2003.
- [83] F. C. Clarke, M. J. Jamieson, D. A. Clark, S. V. Hammond, R. D. Jee, et A. C. Moffat, « Chemical image fusion. The synergy of FT-NIR and Raman mapping microscopy to enable a more complete visualization of pharmaceutical formulations », *Anal. Chem.*, vol. 73, no 10, p. 2213-2220, mai 2001.
- [84] S. Ensslin, K. P. Moll, K. Paulus, et K. Mäder, « New insight into modified release pellets - Internal structure and drug release mechanism », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 128, no 2, p. 149-156, juin 2008.
- [85] R. Wada, S. H. Hyon, T. Nakamura, et Y. Ikada, « *In vitro* evaluation of sustained drug release from biodegradable elastomer », *Pharm. Res.*, vol. 8, no 10, p. 1292-1296, oct. 1991.
- [86] S. Ensslin, K. P. Moll, H. Metz, M. Otz, et K. Mäder, « Modulating pH-independent release from coated pellets: effect of coating composition on solubilization processes and drug release », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 72, no 1, p. 111-118, mai 2009.
- [87] F. Depypere, P. Van Oostveldt, J. G. Pieters, et K. Dewettinck, « Quantification of microparticle coating quality by confocal laser scanning microscopy (CLSM) », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 73, no 1, p. 179-186, sept. 2009.
- [88] J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire, et J.-F. Colombel, « The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications », *Gut*, vol. 55, no 6, p. 749-753, janv. 2006.
- [89] W. R. Best, J. M. Beckett, J. W. Singleton, et F. Kern Jr, « Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study », *Gastroenterology*, vol. 70, no 3, p. 439-444, mars 1976.
- [90] R. F. Harvey et J. M. Bradshaw, « A simple index of Crohn's-disease activity », *The Lancet*, vol. 315, no 8167, p. 514, 1980.
- [91] P. A. van Hees, P. H. van Elteren, H. J. van Lier, et J. H. van Tongeren, « An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. », *Gut*, vol. 21, no 4, p. 279-286, janv. 1980.
- [92] A. Bourreille, M. Doubremelle, et J.-F. Colombel, « [Antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies: new biological tools for diagnosis of inflammatory bowel disease] », *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne*, vol. 24, no 3, p. 147-150, mars 2003.
- [93] E. V. Loftus Jr, « Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences », *Gastroenterology*, vol. 126, no 6, p. 1504-1517, mai 2004.
- [94] Registre des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (EPIMAD), Jean-Frédéric, V.-M. Gwenola, C. Antoine, G.-R. Corinne, S. Jean-Louis, C. M. Daniel, L. M.

Alain, A. M. Emile, Q. M. Patrice, B.-P. M, S. M. Alain, L. M. Francois, N. M. Roger, S. M. Bernard, B. M. Pierre, B. M. Yves, H. M. Bernard, B. D. T. M. Guy, P. M. Jean-Claude, D. M. Jean-Francois, et N. M. Bernard, « Épidémiologie et facteurs de risque des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin », Bull. Académie Natl. Médecine, vol. 191, no 6, p. 1105-1123, 2007.

[95] C. Gower-Rousseau, « Epidémiologie des maladies inflammatoires chroniques de l'Intestin en France : apport du registre EPIMAD », Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012.

[96] E. F. Stange, S. P. L. Travis, S. Vermeire, C. Beglinger, L. Kupcinkas, K. Geboes, A. Barakauskiene, V. Villanacci, A. V. Herbay, B. F. Warren, C. Gasche, H. Tilg, S. W. Schreiber, J. Schölmerich, et W. Reinisch, « European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis », Gut, vol. 55, no suppl 1, p. i1-i15, janv. 2006.

[97] A. Dignass, R. Eliakim, F. Magro, C. Maaser, Y. Chowers, K. Geboes, G. Mantzaris, W. Reinisch, J.-F. Colombel, S. Vermeire, S. Travis, J. O. Lindsay, et G. Van Assche, « Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis », J. Crohns Colitis, vol. 6, no 10, p. 965-990, déc. 2012.

[98] D. C. Baumgart et S. R. Carding, « Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology », The Lancet, vol. 369, no 9573, p. 1627-1640, 2007.

[99] V. D. Peltekova, R. F. Wintle, L. A. Rubin, C. I. Amos, Q. Huang, X. Gu, B. Newman, M. V. Oene, D. Cescon, G. Greenberg, A. M. Griffiths, P. H. St George-Hyslop, et K. A. Siminovitch, « Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease », Nat. Genet., vol. 36, no 5, p. 471-475, mai 2004.

[100] M. Stoll, B. Corneliussen, C. M. Costello, G. H. Waetzig, B. Mellgard, W. A. Koch, P. Rosenstiel, M. Albrecht, P. J. P. Croucher, D. Seegert, S. Nikolaus, J. Hampe, T. Lengauer, S. Pierrou, U. R. Foelsch, C. G. Mathew, M. Lagerstrom-Fermer, et S. Schreiber, « Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease », Nat. Genet., vol. 36, no 5, p. 476-480, mai 2004.

[101] J.-P. Hugot, M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.-P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.-F. Colombel, M. Sahbatou, et G. Thomas, « Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease », Nature, vol. 411, no 6837, p. 599-603, mai 2001.

[102] Y. Ogura, D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J.-P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nuñez, et J. H. Cho, « A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease », Nature, vol. 411, no 6837, p. 603-606, mai 2001.

[103] L. Peyrin-Biroulet, C. Vignal, R. Dessein, M. Simonet, P. Desreumaux, et M. Chamaillard, « NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation », Trends Microbiol., vol. 14, no 10, p. 432-438, oct. 2006.

- [104] P. Desreumaux et M. Malapel, « Nod2/CARD15 : quelles fonctions au niveau intestinal ? » févr. 2008.
- [105] M. Zemljic, B. Pejkovic, I. Krajnc, et S. Lipovsek, « Biological pathways involved in the development of inflammatory bowel disease », *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 126, no 19-20, p. 626-633, oct. 2014.
- [106] A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A.-L. Glasser, N. Barnich, M.-A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, et J.-F. Colombel, « High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease », *Gastroenterology*, vol. 127, no 2, p. 412-421, août 2004.
- [107] P. Jantchou, E. Monnet, et F. Carbonnel, « Les facteurs d'environnement dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (tabac et appendicectomie exclus) », *Gastroentérologie Clin. Biol.*, vol. 30, no 6-7, p. 859-867, juill. 2006.
- [108] D. L. Morris, S. M. Montgomery, N. P. Thompson, S. Ebrahim, R. E. Pounder, et A. J. Wakefield, « Measles vaccination and inflammatory bowel disease: a national British cohort study », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 95, no 12, p. 3507-3512, déc. 2000.
- [109] C. N. Bernstein et F. Shanahan, « Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases », *Gut*, vol. 57, no 9, p. 1185-1191, janv. 2008.
- [110] B. Rubini, S. Jaafar, H. Gaucher, A. Kissel, G. Gobertier-Gasparini, J. M. Fromaget, D. Tabary, M. Muller, et J. C. Etzel, « [Value of sonography in the diagnosis and follow-up of patients with cryptogenic inflammatory bowel diseases in current practice: review of a 10-year experience in a community hospital] », *J. Radiol.*, vol. 82, no 11, p. 1601-1611, nov. 2001.
- [111] J. F. Colombel, W. J. Sandborn, W. Reinisch, G. J. Mantzaris, A. Kornbluth, D. Rachmilewitz, S. Lichtiger, G. D'Haens, R. H. Diamond, D. L. Broussard, K. L. Tang, C. J. van der Woude, P. Rutgeerts, et SONIC Study Group, « Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease », *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no 15, p. 1383-1395, avr. 2010.
- [112] S. P. L. Travis, E. F. Stange, M. Lémann, T. Oresland, Y. Chowers, A. Forbes, G. D'Haens, G. Kitis, A. Cortot, C. Prantera, P. Marteau, J.-F. Colombel, P. Gionchetti, Y. Bouhnik, E. Tiret, J. Kroesen, M. Starlinger, N. J. Mortensen, et European Crohn's and Colitis Organisation, « European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management », *Gut*, vol. 55 Suppl 1, p. i16-35, mars 2006.
- [113] A. Dignass, G. Van Assche, J. O. Lindsay, M. Lémann, J. Söderholm, J. F. Colombel, S. Danese, A. D'Hoore, M. Gassull, F. Gomollón, D. W. Hommes, P. Michetti, C. O'Morain, T. Oresland, A. Windsor, E. F. Stange, S. P. L. Travis, et European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO), « The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management », *J. Crohns Colitis*, vol. 4, no 1, p. 28-62, févr. 2010.
- [114] « ALD n° 24 - Guide médecin sur la maladie de Crohn ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.has-sante.fr/portail/plugins/>
- [115] « DIFICLIR SYNTHÈSE - CT12235 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.has-sante.fr/portail/plugins/>

Chapitre I

**Revue critique des méthodes de
test de libération de principes
actifs à ciblage colique à partir
de formulations solides sensibles
aux enzymes bactériennes**

Présentation

Le traitement des maladies coliques est difficile à cause de concentration en PA souvent faible au niveau du côlon dûe à une libération précoce dans le HTGI (et de l'absorption dans la circulation sanguine et de la distribution du PA dans les tissus sains, conduisant à des effets secondaires indésirables). Le traitement de ces pathologies peut être amélioré en augmentant la concentration du médicament au niveau du site cible (ciblage colique). De nombreuses stratégies exploitant divers paramètres physiologiques du tractus gastro-intestinal ont été proposées pour cibler la libération du médicament dans la partie colique de l'intestin.

Dans cette revue, une bref introduction développe les intérêts et la portée des formulations à libération colique en insistant sur les formulations sensibles à l'action des enzymes bactériennes. Les caractéristiques de la microflore colique et des polysaccharides utilisés dans cette stratégie sont décrites. Le principal objectif de cette partie est d'établir une revue des différentes méthodes de test de libération des principes actifs des formulations à ciblage colique qui ont été utilisées durant les 20 dernières années (car aucun standard n'existe) et de les discuter. Les méthodes *in vitro* utilisant des dispositifs communément employés, les milieux de dissolution, le dispositif complexe « bouche-côlon » et les méthodes *in vivo* telles que l'utilisation de rats, de chiens ou d'hommes représentent un panel de méthodes de test de la libération des principes actifs à partir de formulation à libération ciblée au niveau du côlon par l'action des enzymes bactériennes et sont discutées dans ce travail.

I. Introduction

Le traitement des maladies coliques est difficile à cause d'une concentration en PA qui reste faible compte tenu de sa libération dans HTGI (et de son absorption dans la circulation sanguine et sa distribution dans les tissus sains, conduisant à des effets secondaires indésirables). Le traitement peut être amélioré en augmentant la concentration de la substance active (SA) au niveau du site cible (ciblage colique). La libération colique du médicament possède un intérêt pour les chronothérapies ou pour l'absorption de médicament peptidique. La libération colique du principe actif nécessite:

- La résistance à l'acidité gastrique
- La résistance à l'environnement du HTGI
- Suivie d'une libération du principe actif lors de la dégradation locale du système galénique.

De nombreuses stratégies exploitant divers paramètres physiologiques du tractus gastro-intestinal ont été proposées pour cibler la libération de SA dans la partie colique de l'intestin [1], [2]. Des études ont été effectuées en utilisant des systèmes d'administration basés sur l'utilisation de polymères sensibles aux variations du pH [3], [4], des formes à libération en fonction du temps [5], [6], des prodrogues [7], [8], des enrobages, des matrices ou des hydrogels en polymères dégradables par les enzymes bactériennes ou des systèmes de matrice et un hydrogel dégradé par les bactéries [9]–[13], ou encore des combinaisons de différentes stratégies [14], [15]. Le temps de transit et le pH des différents compartiments de l'intestin peuvent grandement varier d'un individu à l'autre. Ils sont également fortement influencés par des maladies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Ainsi, parmi toutes ces stratégies, celle utilisant les enrobages ou matrices en polymères sensibles aux enzymes bactériennes semble la plus spécifique. La microflore colique est variée et la quantité bactérienne colique est beaucoup plus élevée que dans le reste du tractus gastro-intestinal (1000 fois plus importante que dans l'intestin grêle). Les bactéries intestinales possèdent une activité enzymatique spécifique absente dans le HTGI telle que la dégradation des polysaccharides, ce qui rend cette activité spécifique au côlon.

Pour mimer les conditions coliques, différents paramètres physicochimiques doivent être rassemblés :

- Le pH,

- Les types bactériens (différents types de souches bactériennes, différents types d'enzymes et leurs activités),
- Une quantité d'eau réduite : le côlon est le compartiment dans lequel l'eau et le sodium sont réabsorbés,
- Le péristaltisme colique,
- La température,
- Une atmosphère anaérobie.

Dans cette revue, une bref introduction développe les intérêts et la portée des formulations à libération colique en insistant sur les formulations sensibles à l'action des enzymes bactériennes. Les caractéristiques de la microflore colique et des polysaccharides utilisés dans cette stratégie sont décrites. Le principal objectif de ce papier est d'établir une revue des différentes méthodes de tests de libération des principes actifs des formulations à ciblage colique qui ont été utilisées durant les 20 dernières années (car aucun standard n'existe) et de les discuter. Les méthodes *in vitro* utilisant les appareils communément employés, les milieux de dissolutions, le dispositif complexe « bouche-côlon » et les méthodes *in vivo* telles que l'utilisation de rats, chiens, Hommes représentent un panel de méthodes de test de la libération des principes actifs à partir de formulation à libération ciblée au niveau du côlon par l'action des enzymes bactériennes.

II. Intérêt, portée et description d'une stratégie spécifique pour la conception de formulations à libération colique

1. Intérêt et portée

Les systèmes à libération colique ont été reconnus pour avoir un effet thérapeutique bénéfique. Ils améliorent significativement le traitement de nombreuses pathologies touchant le côlon telles que les MICI, le cancer du côlon [16] le syndrome de l'intestin irritable et la constipation. La libération colique est également utilisée pour les chronothérapies, quand, un délai à l'absorption est nécessaire, spécialement dans les pathologies telles que l'asthme nocturne, l'angine de poitrine [17] ou le traitement de la dépendance à la nicotine. L'absorption des peptides et protéines est aussi améliorée au niveau du côlon. Cette particularité est due à une activité protéolytique plus faible à ce niveau du tube digestif, à l'absence d'activité des peptidases associées à la membrane des cellules épithéliales coliques

et à un long temps de transit qui permet d'augmenter le temps de contact et la surface d'absorption. Il y a donc un intérêt à l'utilisation de ciblage colique pour l'absorption des principes actifs peptidiques [18] tels que les analgésiques, les contraceptifs, les vaccins ou l'insuline qui sont pour l'instant des PA administrés par voie parentérale, qui est douloureuse, qui entraîne une diminution de l'acceptabilité du traitement par le patient et qui peut induire des infections. Le Tableau 1 répertorie des exemples d'intérêts de ciblage colique avec les PA libérés et les formulations utilisées, décrits dans la littérature.

Tableau 1: Exemples d'utilisation de la libération colique ciblée des PA

Utilisations	Symptômes	PA	Formulations	Ref
Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin	Maladie de Crohn : Diarrhées, douleurs et crampes abdominales, présence de sang dans les selles, ulcères, diminution de l'appétit et perte de poids. Rectocolite hémorragique : inflammation du rectum, saignements et douleurs rectales	Mesalazine	MMX (multi Matrix System) : enrobage composé de mélange d'Eudragit® L/S	[19] [20]–[23]
		Budesonide	Minigranules adhérentes au côlon composées de Carbomer 940 et d'hydroxypropyl cellulose (HPC) et enrobées de Surelease(®)and Eudragit(®)	[24]
		Prednisolone	Comprimés matriciels composés de Chitosan/ Pectine	[25]
		Parnaparine	MMX (multi Matrix System)	[26], [27]
		Butyrate de Sodium	Comprimés matriciels composés de Eudragit® RS100 : Guar gum 2: 4	[28]
		Curcumin	MMX (multi Matrix System)	[29]
		Micheliolide	Comprimés enrobés d'Hydroxy propyl methyl cellulose and de gomme laque	[30]
				Micro-éponge composées de Eudragit®-L100-PVA
Cancer du côlon	Modifications des habitudes intestinales, diminution de la quantité de selles, saignements rectaux ou présence de sang dans les selles inconfort abdominal persistant avec crampes, flatulence, douleurs, perte de poids inexplicable,	5-fluorouracil	Microgranules de Dextran enrobées d'Eudragit® S100	[34]
		Irinotecan	Minigranules enrobées d'Ethylcellulose : pectine (8:3 w/w ratio)	[35]
		Oxali-palladium	Transporteur liposomale	[36]
		p 53 polyplex	Nanocapsules composées de β-Lactoglobuline	[37]
		Tetrahydro-curcumin	Microgranules chargée de pactinate de calcium à enrobage entérique	[38]
		Prodrogue	[39]	
Préparation intestinale préopératoire	-	Levofloxacin	Microgranules de Chitosan	[40]
Chronothérapies à effets Anti-inflammatoires	-	Quercetin	Comprimés oraux composés de microparticules de Chitosan– gomme xanthane	[41]
		Acide Biphenyl-acétique (bioprecurseur du fenbufen)	Prodrogue	[42]
Diabète	-	Gliclazide-Acides Choliqes	Microcapsules d'alginate de sodium basse viscosité (LVSA)	[43]
		Insuline	Formes multiples	[44]
Syndrome de l'intestin irritable	Douleur abdominale avec crampe, ballonnements, flatulences, diarrhées ou constipation, présence de mucus dans les selles	Ondansetron	Microsphere de Eudragit® S-100 -chitosan	[45]
		Mebeverine	Comprimés d'ethylcellulose (EC) et Eudragit® RL 100	[46]
Amibiases	-	Metronidazole	Prodrogue de Sulfate conjugués	[47]
Diverticuloses	Diverticules dans la lumière du côlon dues à des infections bactériennes	Bactrim, Flagyl, Sulfatrim, Metronidazole, mesalazine, Rifamixin		[48]

2. Les formulations sensibles aux enzymes bactériennes, une stratégie spécifique

Les systèmes galéniques utilisant l'activité enzymatique de la microflore colique sont probablement les plus spécifiques pour la libération colique. La microflore intestinale possède de multiples activités enzymatiques (particulièrement la digestion de polysaccharides complexes tels que les mucines ou les résidus de fibres alimentaires qui sont leur principal substrat) absentes des cellules humaines. Cela fait de la microflore colique un précieux outil pour l'amélioration du ciblage colique.

Ce concept peut être divisé en :

- L'utilisation de précurseur clivés par les enzymes bactériennes dans le côlon [7], [8]. Mais la présence des enzymes nécessaires peut être compromise par la pathologie [49].
- L'utilisation d'outils (enrobage/ matrices) digérés par les enzymes bactériennes (évitant l'utilisation de précurseurs).

a) La microflore intestinale et ses activités métaboliques

Le côlon de l'Homme est colonisé par une dense microflore, cet écosystème est diversifié et peut contenir plus de 1000 espèces bactériennes différentes avec un large potentiel métabolique [50] et représente approximativement 10^{14} microorganismes [51]. La microflore colique comprend au moins 1000 fois plus de bactéries que les autres compartiments du tube digestif. Malgré quelques effets délétères (réservoir potentiel de pathogènes), ses fonctions sont souvent bénéfiques (symbiose) : barrière contre les pathogènes, immunomodulation, la capacité de métaboliser certaines substances (dans des conditions anaérobies c'est-à-dire une métabolisation différente de celle dans les cellules humaines), et amélioration de la trophicité mucosale et de la motilité intestinale. Le microbiome colique est souvent présenté comme un organe virtuel. Les fonctions des bactéries digestives appartiennent à trois types [52]:

- Les fonctions métaboliques avec la production d'acides gras volatils à chaînes courtes (short-chain fatty acids SCFA), l'amélioration de l'absorption et la récupération ionique, le métabolisme des xénobiotiques, le métabolisme des acides biliaires et la régulation du transit intestinal.
- Les fonctions protectrices de « la barrière intestinale » par la bonne adaptation aux nutriments disponibles, les changements du pH intraluminal et l'occupation de

potentiel site de colonisation par des bactéries non pathogènes, principalement dans la couche de mucus.

- Les fonctions de trophicité par la facilitation de prolifération et de différenciation épithéliale et la promotion du système immunitaire.

D'importantes dysbioses sont observées dans les désordres digestifs associés aux traitements antibiotiques, à la maladie de l'intestin irritable, aux épisodes de diarrhées et aux MICI, mais aussi dans les néoplasies gastro-intestinale, l'obésité et les allergies. Les manipulations thérapeutiques de la microflore intestinale peuvent se faire par l'intermédiaire des antibiotiques mais aussi via des microorganismes tels que les probiotiques ou des substrats spécifiques tels que les prébiotiques. La nourriture peut également moduler dans une moindre mesure le microbiote [53].

Dans le côlon, l'oxygène n'est pas disponible, le métabolisme est essentiellement anaérobie. Des substrats endogènes sont toujours présents et les plus abondants sont les mucines intestinales. Ces composés de haut poids moléculaires ressemblent à des goupillons avec un noyau central protéique et des extensions de O-glycanes dans toutes les directions tels des poils de brosse [50]. 80% de la masse des mucines sont des glycanes et plus de 100 différents glycanes sont observés [50]. Les mucines représentent la majeure partie de la couche de mucus qui est une couche protectrice continue sur l'épithélium intestinal. La partie interne de la couche est presque stérile et aide à garantir la stérilité de l'épithélium intestinal sain sous-jacent [54]. La partie externe de la couche est colonisée par des bactéries attachées aux résidus de sucres des mucines. Les bactéries liées à la couche de mucus font partie de la flore normale avec un faible potentiel pathogène. Ils occupent potentiellement tous les sites disponibles qui ne sont donc plus disponibles pour les autres bactéries (potentiellement plus pathogènes). La flore normale se lie aux mucines mais est également capable de dégrader lentement ces composés [55]. Comme les mucines sont continuellement sécrétées par les cellules caliciformes, la couche externe du mucus est régulièrement desquamée (Figure 1). Ainsi, cette lente lyse du mucus par les bactéries ne détruira jamais totalement la couche de mucus. Les chaînes oligosaccharidiques des mucines peuvent être de longueurs variées, contenir différents types de monosaccharides (glucose, galactose, N-acetylglucosamine; N-acetylgalactosamine, fucose, mannose) et différents types de liens (α -1,2; α -1,3; α -1,4; α -2,3; α -2,8; β -1,4 par exemple) [56]. Ainsi, les bactéries mucolytiques ont besoin de différents types de glycosidases pour être capables de cliver ces différents liens [57], [58]. Toutes ces enzymes doivent être présentes à l'extérieur de la bactérie (sécrétion extracellulaire ou

enzymes membranaires extracellulaires), et les mucines de haut poids moléculaire sont incapables de pénétrer dans les bactéries [57]. Les bactéries mucolytiques intestinales de la flore normale avec un faible potentiel pathogène chez l'Homme appartiennent généralement aux genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* and *Akkermansia* [55], [57], [59], [60]. Les exoglycosidases libèrent des monosaccharides [50]. Seule la souche *Bifidobacterium bifidum* est capable de sécréter aussi des endoglycosidases, principalement la endo- α -N-acetylgalactosaminidase qui clive directement les glycanes du noyau protéique [57], [60].

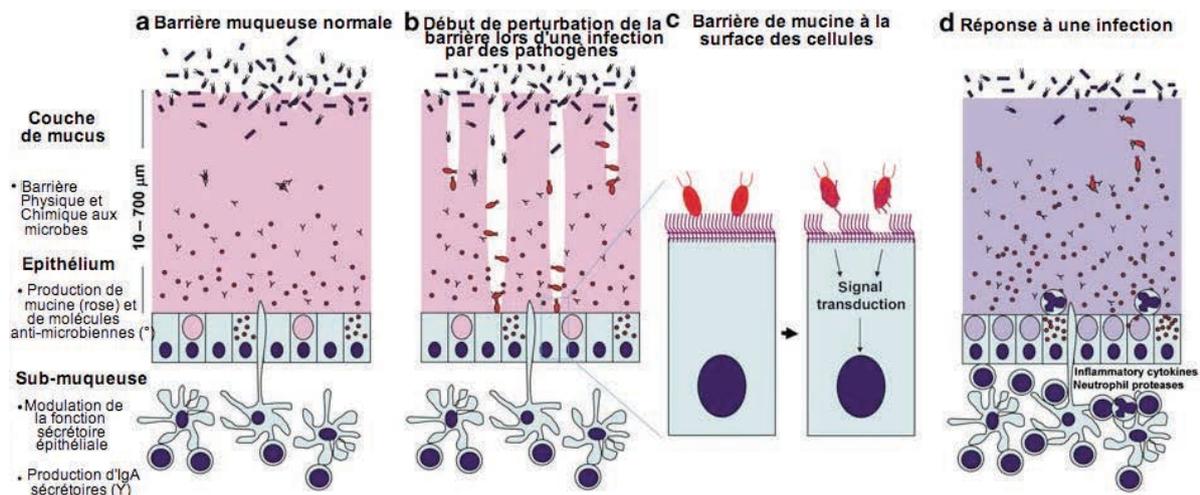


Figure 1 : Schéma des mucines de la barrière muqueuse. (a) La muqueuse normale recouverte d'une couche de mucus épais, le contact des microbes commensaux et environnementaux avec les cellules épithéliales reste rare. (b) Au début de l'infection, des agents pathogènes perturbent la couche de mucus ce qui leur permet d'avoir accès à la surface des cellules épithéliales. Une modification de l'environnement pour les microbes commensaux se produit et la pathogenèse opportuniste peut se produire. (c) Les agents pathogènes brisent la barrière de mucus et atteignent la surface de la membrane apicale. Ils se fixent aux mucines de surface cellulaire via des interactions avec les lectines. Après le contact entre les microbes et les domaines extracellulaires des mucines, la transduction du signal par les domaines cytoplasmiques des mucines de surface cellulaire module la réponse cellulaire à la présence de microbes. (d) En réponse à l'infection, il y a des altérations dans les mucines en réponse aux signaux provenant de l'immunité naturelle et acquise. Ces modifications incluent une hyperplasie des cellules à mucus, une augmentation de la sécrétion de mucine et la glycosylation de la mucine modifiée (représentée par le changement de couleur) affectant l'adhésion microbienne et la capacité à dégrader les microbes dans le mucus. [54].

Les diverses exoglycosidases sont capables de digérer des substances exogènes, chez l'Homme principalement des polysaccharides végétaux présents dans les aliments tels que la pectine, les amidons résistants et, dans une moindre mesure, la cellulose. Les bactéries digèrent ces polysaccharides non digestibles dans l'intestin grêle en SCFA. Ces acides sont

réabsorbés par l'épithélium colique ; l'énergie est récupérée pour le corps humain par fermentation bactérienne intestinale. Ces interactions ont suscité un récent intérêt établissant un lien entre la microflore intestinale et de l'énergie de l'obésité [61], [62].

Les exoglycosidases des bactéries intestinales sont capables de digérer des substrats variés. Elles peuvent être des outils fiables pour le ciblage colique des PA lorsque des polysaccharides non digestibles par les enzymes humaines sont utilisés dans l'enrobage de formulations. La pectine et les amidons résistants ont été utilisés avec succès mais des structures avec différents types de liaisons représentent une approche plus spécifique assurant une libération du PA en présence d'un cocktail d'enzymes uniquement présent dans le milieu colique. Pour augmenter la diversité des types de liaisons, des polysaccharides modifiés chimiquement ont été créés. Ceux-ci présentent donc l'inconvénient d'être moins disponibles et plus chers que les polysaccharides naturels, et peuvent être responsables de la production de composés de digestion non habituels. Les formulations composées de PA enrobés par des polysaccharides naturels offrent la possibilité de cibler la libération du PA au niveau du côlon sans effets secondaires toxiques.

b) Les polymères spécifiquement digérés par la microflore colique et les principaux polysaccharides adaptés pour le ciblage colique

Les enrobages composés de polysaccharides ne devraient pas se solubiliser avant d'atteindre le côlon. Puis, ils devraient être lentement digérés et libérer une concentration efficace de PA à travers le côlon. Pour assurer l'intégrité des minigranules enrobées il peut être nécessaire de mélanger des polysaccharides plus ou moins solubles en milieu aqueux. L'addition de calcium ou l'association avec d'autres polymères peut aussi permettre de diminuer la solubilité des polysaccharides.

Les avantages de l'utilisation de polysaccharides sont leurs caractères :

- Naturel, abondant and bon marché,
- Biodégradable,
- Non-toxique (ne requiert pas d'étude de toxicité avant leur utilisation dans des formulations médicamenteuses car ils sont déjà utilisés communément dans l'industrie alimentaire),
- Fermentable dans le côlon entraînant la formation de SCFA qui sont rapidement absorbés dans le côlon et qui stimulent la réabsorption de sodium et d'eau.

Pour les traitements des MICI, il est nécessaire de choisir des polysaccharides digérés spécifiquement par des bactéries de la flore intestinale modifiée des patients souffrant de ces pathologies (Table 2).

Dextrines

Les dextrines sont des polymères de glucose, le plus abondant est l'amidon. Il se présente sous forme de granules microscopiques dans les tissus des végétaux comme polysaccharide de stockage et est dégradé par de nombreuses espèces bactériennes. Il est composé de deux polysaccharides: l'amylose et l'amylopectine qui sont généralement dégradés dans l'intestin grêle par les amylases humaines. L'amylose est un α -glucane essentiellement linéaire contenant des liaisons α -(1,4). L'amylopectine a un poids moléculaire beaucoup plus élevé que l'amylose et est beaucoup plus fortement ramifiée, avec environ 95% de liaisons α -(1,4) et 5% de α -(1,6) [63]. La quantité d'amylose habituellement présente dans l'amidon est comprise entre 20% et 35%. Les producteurs ont développé des amidons qui contiennent une quantité d'amylose comprise entre 50% et 80%. Seule une partie de l'amidon, appelé amidon résistant, résiste aux enzymes pancréatiques de l'HTGI et atteint le côlon. Lorsque ces polysaccharides sont utilisés, une attention particulière doit être donnée à la vérification de la faible libération du PA dans le HTGI. Cependant, toutes les formes d'amylose ne sont pas résistantes à la digestion dans le HTGI. Les amidons résistants peuvent être développés par la formation d'une structure amorphe (amylose amorphe) qui peut être dégradé par les bactéries coliques [64]–[68]. Pour ces raisons, l'amylose vitreux a été choisi pour le ciblage colique de PA, en raison de sa microstructure d'amylose rétrogradé résistant à la digestion dans le HTGI par des enzymes pancréatiques [65]–[67]. L'amylose a été utilisé dans les enrobages de formulations à ciblage colique [68]. Un inconvénient de l'amylose est son gonflement dans les milieux aqueux, ceci entraîne une libération accélérée du médicament. Des films composés uniquement d'amylose absorbent des quantités considérables d'eau lors d'une exposition à des milieux aqueux. Ils deviennent très perméables et le PA se libère dans le HTGI avant d'atteindre le tube digestif distal. Pour contrôler ce gonflement, des polymères à libération contrôlée disponibles dans le commerce (par exemple l'éthylcellulose, EC) ont été mélangés avec l'amylose afin d'empêcher la libération du PA dans l'estomac et l'intestin grêle. Il a été conclu que le rapport de l'amylose :EC et le niveau d'enrobage jouent un rôle majeur dans le contrôle de la libération du médicament à partir de ces systèmes. Un enrobage composé d'un mélange d'amylose:Eudragit® a également été utilisé pour retarder la libération du PA et cibler le côlon [69]. En effet, Eudragit® est un

copolymère d'éthyle acrylate, de méthyl méthacrylate et d'ester d'acide méthacrylique avec un groupe ammonium quaternaire présent sous forme de sels qui rendent le polymère perméable. Ce polymère est insoluble dans l'eau mais lorsqu'il est mélangé avec un polysaccharide soluble dans les milieux aqueux, il agit en diminuant sa solubilité. L'Eudragit® n'est pas biodégradable mais il est hydraté dans les fluides gastro-intestinaux indépendamment du pH.

Une autre technique, pour réduire le caractère hydrophile de l'amylose est de l'associer avec un polymère hydrophobe. L'éthyl méthacrylate (EMA) a été greffé sur un amidon à haute teneur en amylose pour obtenir un amylose hydrophobe et augmenter sa résistance aux enzymes digestives [70]. Pour obtenir une résistance enzymatique élevée, il était nécessaire d'utiliser de grandes quantités de méthacrylate d'éthyle. En dépit d'un enrobage de l'amylose par du méthacrylate d'éthyle, l'hydrate de carbone de méthacrylate d'éthyle-amylose est sensible à la fermentation dans le côlon humain.

Les dextrans font partie d'une classe de polysaccharides naturels composée d'un squelette polymérique linéaire assemblé principalement de liaisons 1,6- α -D-glucopyranoside avec des chaînes latérales supplémentaires assemblées par des liaisons α -(1,4) et α -(1,3). Ils sont résistants à l'action des amylases humaines, mais leur digestion par des enzymes bactériennes dans des selles humaines a été observée [71]. Diverses prodrogues composées de PA lié à la macromolécule polaire de dextran restent intactes et non absorbées par l'estomac et l'intestin grêle, mais lorsque la prodrogue pénètre dans le compartiment colique, il est dégradé par les dextranases. Des conjugués de Dextran et d'acide 5-aminosalicylique ont été synthétisés et évalués pour le ciblage colique de PA [72].

Des dextrans plus complexes peuvent être élaborés contenant différents types de liaisons qui les rendent plus résistants aux enzymes pancréatiques humaines. Par exemple, le Nutriose®, une maltodextrine ramifiée soluble dans l'eau obtenue à partir d'amidon de blé s'est révélé être particulièrement prometteuse [14], [15], [63]. Grâce à la présence de liaisons α -1,6 et de liaisons glycosidiques non digestibles (par exemple α -1,2 and α -1,3), le Nutriose® n'est hydrolysé et absorbé que partiellement dans l'intestin grêle (environ 10-15 %). Mais ce dérivé d'amidon est progressivement fermenté dans le côlon (85%) [73], [74]. De plus, le Nutriose® est connu pour avoir une significative activité prébiotique, permettant de normaliser la microflore et les enzymes bactériennes coliques des patients [73]–[75]. C'est un grand bénéfice clinique pour ce type de pathologies du tube digestif.

Inuline

L'inuline est un glucofructane naturellement présent dans de nombreuses plantes comme l'oignon et de la chicorée. Ce polysaccharide consiste en une chaîne de molécules de D-fructose liées par des liaisons β -(1-2) avec une unité glycosidique à l'extrémité réductrice. L'inuline n'est pas significativement hydrolysée par les enzymes du HTGI, cependant les bactéries coliques et plus spécifiquement les bifidobactéries peuvent dégrader ce polysaccharide lui conférant un effet prébiotique [76]. Cependant, la quantité de bifidobactéries est souvent réduite chez les patients atteints de MICI [77], [78]. L'inuline, avec un degré de polymérisation important, peut être utilisée comme composé biodégradable l'Eudragit® RS pour diminuer l'hydrosolubilité du polysaccharide [79]. Ainsi, l'inuline peut apporter le caractère biodégradable de la formulation et des films composés d'un mélange d'Inuline et d'Eudragit® RS résistent à des fluides gastriques et intestinaux, qui indiquent que ce système d'enrobage pourrait également être utilisé pour le ciblage colique de PA. La digestion bactérienne dépend de l'hydrophylité du plastifiant. Cependant, Eudragit® RS et RL, en combinaison avec l'inuline permettent d'obtenir des films libres qui montrent un gonflement et une perméabilité du PA plus importante dans le milieu colique que dans les fluides gastriques et intestinaux [80].

Pectine

La Pectine est un polysaccharide non linéaire de l'amidon qui consiste principalement en α -(1,4) acide D-galacturinique et de α -(1,2) L-rhamnose qui se trouve dans les parois cellulaires des plantes. La pectine n'est pas digérée dans le HTGI mais est totalement dégradée par les enzymes bactériennes [81]–[84]. L'inconvénient de la pectine est sa solubilité. Pour surmonter ce problème, le degré de méthylation a été modifié et la préparation de pectinate de calcium a été réalisée afin de rendre la pectine résistante dans le HTGI [81]. Des combinaisons de pectine et d'ethylcellulose ont été utilisées pour enrober des comprimés de paracétamol [85]. La libération de PA se révélait être dépendante de la nature et des caractéristiques du film ainsi que de la composition du milieu de dissolution. Des minigranules d'acide 5-aminosalicylique enrobées de mélange pectine:EC ont été préparées et évaluées pour la libération du PA au niveau colique. Les résultats de cette étude révèlent que la composition du fluide gastrique simulé (les caractéristiques d'hydratation et de gonflement de la pectine), ainsi que le ratio pectine :EC possèdent une influence sur la libération du PA [86]. La pectine a également été étudiée en combinaison avec d'autres polysaccharides tels que le Chitosan [87], [88] et l'hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) [89]. Et, finalement,

une association avec des cations divalents (Ca^{2+}) et un biopolymère cationique oligochitosan a montré, dans la littérature, une amélioration de la stabilité d'un système d'hydrogel à base de pectine ce qui suggère que ces deux agents de réticulation peuvent être éventuellement utilisés pour aider à améliorer les systèmes d'hydrogel à base de pectine pour les méthodes de délivrance du PA dans le côlon [90].

Chitosan

Le Chitosan est un polysaccharide aminé naturel. Il est obtenu par N-déacétylation alcaline de la chitine, le second polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose et isolé dans l'exosquelette des crustacées et des champignons. Le Chitosan est un copolymère de N-acetyl-D-glucosamine et D-glucosamine [91], [92]. Ce polysaccharide est digéré par les enzymes de la microflore colique [93] et non par les enzymes digestives du HTGI [94]. Le Chitosan est déjà utilisé pour la formulation de médicaments administrés par voie orale à libération colique et ces systèmes sont discutés par de nombreux chercheurs [95]. L'insuline et l'acide 5-aminosalicylique ont été administrés à des rats par l'intermédiaire de capsules de chitosan recouvertes d'un enrobage entérique. Il est également considéré comme un candidat potentiel pour la libération colique des PA grâce à ces propriétés biologiques favorables (par exemple la non toxicité, la biocompatibilité et biodégradabilité). Récemment, une formulation de comprimé a été développée utilisant un mélange chitosan: gomme guar comme support du comprimé matriciel, enrobé d'une première couche de inuline puis de gomme laque [96]. Un autre système innovant consistant en un comprimé enrobé d'un mélange chitosan-Kollicoat Smartseal 30 D a été décrit pour cibler la libération de PA au niveau du côlon [97].

Galactomannane

Les β (1-4) galactomannanes sont présents naturellement dans les graines de caroube. Une autre galactomannane est la gomme guar, obtenue à partir d'endosperme *Cyamopsis tetragonolobus*, qui est une galactomannane composée de chaînes linéaires d'unités (1,4)- β -D-mannopyranosyl avec des liaisons (1,6)- α -galactopyranosyl [98]. La gomme guar est composée d'une partie hydrosoluble (85%), et d'une partie insoluble [99]. La gomme guar réticulée a été utilisée pour la formulation de comprimés matriciels [100], [101]. Une étude a décrit l'encapsulation de complexes de cyclodextrines dans des microsphères de gomme guar pour améliorer la solubilité et optimiser la délivrance colique de bromonoscapine réduite [102].

Alginate

Naturellement présents dans les algues, les alginates sont des blocs polymériques de β -mannuronate et α -guluronate liés part des liaisons (1-4). Comme pour les pectines, la formation de gel est uniquement possible quand leur structure est modifiée par l'addition d'ions Ca^{2+} à cause de la présence d'acides poly(L-guluroniques) qui sont rigides. L'acide 5-aminosalicylique a été pulvérisé sur des noyaux d'alginates de calcium dans des systèmes à libération colique de PA [103]. Ces billes étaient enrobées de différents ratios de polymères entériques et/ou de polymères à libération soutenue (Eudragit® L 30D, Aquacoat®). Des billes d'alginates ont également été enrobées d'acétate de dextran [104].

Arabinoxyrane

Les arabinoxyranes sont naturellement présents dans le *Psyllium* et consistent en unités D-xylose unies par des liaisons β (1-4) et attachées à des fragments d'arabionses. Ce polysaccharide n'est pas dégradé par les enzymes digestives humaines mais par les enzymes bactériennes de la microflore colique en SCFA [105]. Il a déjà été utilisé pour ses effets alimentaires mais aucune étude ne documente son utilisation comme enrobage de formulation à libération colique.

Chondroïtine sulfate

Le seul polysaccharide d'origine animale utilisé pour les formulations à libération colique est le chondroïtine sulfate. Il contient des acides α -glucuroniques liés à des N-acetyl-galactosamines sulfatés. Ce polysaccharide est soluble dans l'eau et des réticulations sont nécessaires pour son utilisation pour la libération colique de PA. En effet, la réticulation diminue l'hydrosolubilité et prévient ainsi la libération prématurée du PA dans l'estomac et l'intestin grêle. Des formulations matricielles contenant de l'indométacine et du chondroïtine sulfate ont été investiguées pour cibler la libération dans le colon [106].

V.Bansal et al. ont décrit 'autre mono-, di- et polysaccharides potentiellement utilisés pour la libération de PA ciblés au niveau du colon tels que la cellulose, l'acide hyaluronique, les cyclodextrines ou le scéroglycane, mais leurs utilisations restent anecdotiques [99].

En conclusion, les polysaccharides adaptés à la libération colique de PA médiée par la microflore intestinale contiennent des monosaccharides ou des liaisons non digérées par les

enzymes humaines. Ces polysaccharides sont fermentés par différents types de micro-organismes dans le but de libérer le PA quelles que soient les conditions physiologiques (présence ou absence d'inflammation) et évitent la diminution de libération du fait de l'appauvrissement pathologique du milieu en bactéries spécifiques telles que les bifidobactéries dans les MICI.

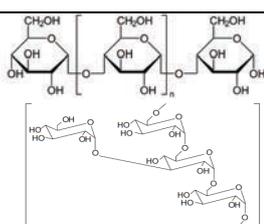
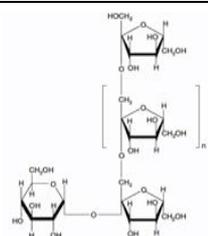
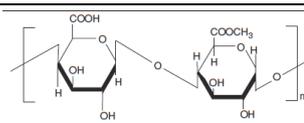
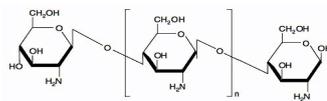
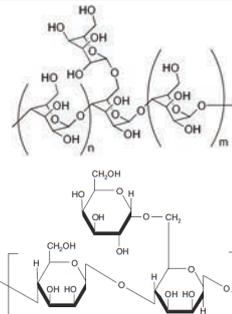
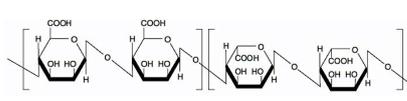
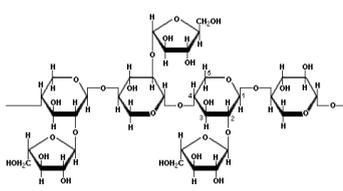
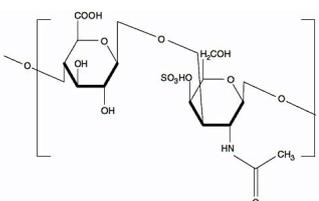
Polysaccharides	Structure	Structural unit	Origin
Dextrines / Dextran		α -1,6-D-glucose	Les polysaccharides les plus abondamment secrétés par des plantes.
Inuline		Molécules de D-fructose connectées par des liaisons β -(1-2) à des unités glycosyl à l'extrémité réductrice.	Différents légumes comme les oignons et la chicorée.
Pectine		α -D-(1,4) galacturonique et α -L-(1,2)-rhamnose	Parois de cellules végétales.
Chitosan		Copolymère de N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine	Exosquelette de crustacés et champignons.
Galactomannane / Gomme guar		(1,4)- β -D-mannopyranosyle et α -galactopyranosyle connectés par des liaisons (1,6)	Graines végétales incluant les graines de caroube.
Alginate		Assemblages de polymères β -mannuronate and α -guluronate liés par des liaisons (1-4)	Présents dans les algues.
Arabinoxylyanes		D-xylose et des fragments d'arabinose unis par des liaisons β (1-4)	<i>Psyllium</i> (parois cellulaires et graines)
Chondroïtine sulfate		Acide α -glucuronique lié à des unités N-acétyl galactosamine sulfatées	Tissus cartilagineux de nombreux invertébrés.

Tableau 2: Résumé des polysaccharides utilisés pour le ciblage colique de PA.

III. Les methodes de test *in vitro*

1. Les dispositifs généralement utilisés

Les appareils de dissolution décrits à la Pharmacopée Européenne (et la Pharmacopée Américaine, USP) sont standardisés et peuvent être utilisés facilement. Ces dispositifs sont repartis en 4 groupes : les appareils à paniers (apparatus I), les appareils à pâles (apparatus II), les appareils à cylindres alternatifs (apparatus III) et les cellules à flux continu (apparatus IV) (Figure 2). Ces dispositifs possèdent des dimensions standardisées avec un volume de milieu de dissolution défini et un niveau d'agitation calibré. Ces caractéristiques rendent leur utilisation plus légitime et permettent la comparaison entre les résultats de libération des différentes formulations. Les appareils à panier sont souvent utilisés dans le cas de formulations multiparticulaires (par exemple les minigranules) ou avec des formulations qui flottent ou qui adhèrent aux parois des récipients et qui par conséquent ne seraient plus assez longtemps en contact avec le milieu de dissolution [107]–[112]. Les appareils à pâles sont les plus largement utilisés et présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre [10], [113]–[120]. Le volume de milieu utilisé est d'environ 900 ml avec les appareils à pâles. Les appareils à cylindres alternatifs sont des dispositifs qui miment mieux les mouvements péristaltiques digestifs que les mouvements rotatoires des pâles [15], [121]. Des dispositifs programmables existent tels que le BioDis® qui permet un enregistrement des changements de milieux de dissolution et des niveaux d'agitation. Le volume du milieu utilisé est d'environ 200 ml avec le BioDis®. Pour finir, les cellules à flux continu permettent de tester la libération à partir de formulation grâce à un renouvellement constant du milieu de dissolution [12], [122], ce qui n'est pas le cas des autres dispositifs précédemment décrits.

Les conditions Sink doivent être maintenues. Elles permettent d'obtenir un test de dissolution valide, c'est à dire, l'utilisation d'un volume de dissolution suffisant évitant un effet de saturation et une modification de la libération de PA à partir de la formulation.

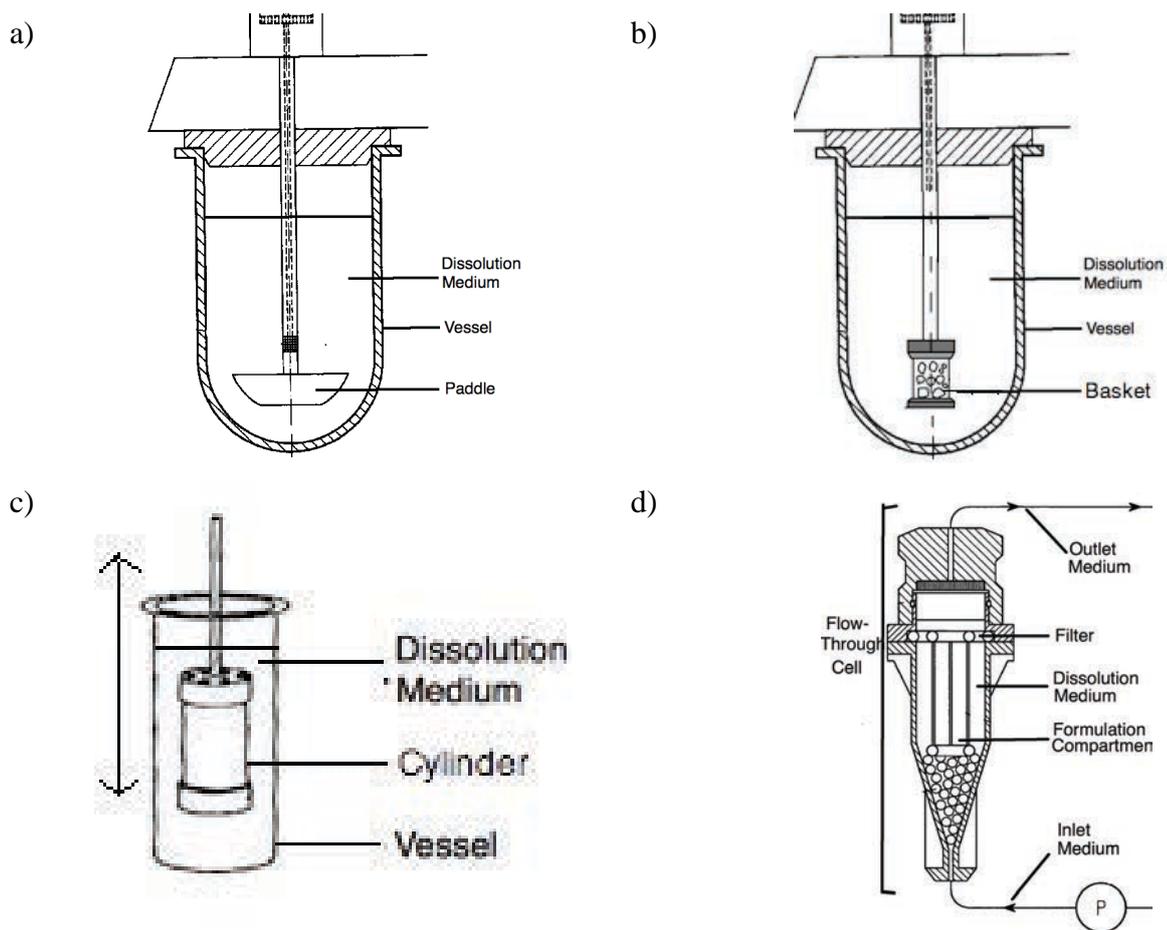


Figure 2: Dispositifs de dissolution décrits dans la Pharmacopée Européenne et USP a) appareil USP I, ou appareil à paniers; b) appareil USP II ou appareil à pâles; c) appareil USP III ou appareil à cylindres alternatifs et d) appareil USP IV ou cellule à flux continu.

Il existe des dispositifs de test de libération de PA *in vitro* pour les formulations à libération colique qui consistent en de simples récipients contenant du milieu de dissolution chauffé et agité dans une chambre mimant les conditions physiologiques (température et péristaltisme digestif). Une telle méthode est utilisée dans le cas de libération de nanoparticules ou de libération à partir de formulations qui requièrent un faible volume de dissolution non compatible avec les appareils décrits dans la Pharmacopée Européenne ou dans USP. Cette technique présente l'inconvénient de ne pas être standardisée, utilisant des récipients de tailles différentes et des niveaux d'agitation du milieu différents et pouvant entraîner des variations dans les résultats de libération des PA.

2. La simulation des compartiments du tube digestif

a) La simulation du compartiment gastrique

Les conditions gastriques sont le plus souvent simulées par l'utilisation de solution d'acide chlorhydrique HCl 0.1 M à pH 1,2 [123]. Le taux d'agitation est de 100 rpm pour l'appareil à pâles alors qu'il n'est que de 10 rpm pour l'appareil à cylindres alternatifs. Le milieu de dissolution est maintenu à 37°C pour mimer les conditions physiologiques. Le temps de simulation du compartiment gastrique est communément fixé à 2 heures mais les Pharmacopées Européenne et américaine n'émettent aucune recommandation concernant ce temps. Dans de nombreuses études, des enzymes gastriques sont utilisées telles que la pepsine [121].

b) Les conditions simulant l'intestin grêle

Les conditions simulant l'intestin grêle sont bien mieux définies. En effet, le compartiment iléal peut être divisé en différentes parties (le duodénum, le jéjunum et l'iléum) avec des pH sélectionnés pour mimer les différentes subdivisions qui peuvent varier de 5,5 à 7,5. La Pharmacopée Européenne [123] recommande de tester la dissolution dans un tampon phosphate de pH 6,8. Quelques études différencient totalement les différentes divisions de l'intestin en différents temps et pH (table 3).

Les segments du tube digestif simulés	Temps d'exposition	Milieu de libération	pH
Estomac	2 h	0.1 M HCl	1,2
Duodenum	0,5 h	Tampon phosphate (Eur. Pharm. 5)	5,5
Jejunum-ileum	9 h	Tampon phosphate (USP 30)	6,8
Caecum	0,5 h	Tampon phosphate (USP 30)	6,0
Côlon proximal	6 h	Tampon phosphate (USP 30)	7,0
Côlon distal	18 h	Tampon phosphate (USP 30)	7,4

Table 3: Les milieux de dissolution utilisés pour simuler l'augmentation graduelle de pH à travers le tractus digestif [15]

Dans certaines études, les enzymes de l'intestin grêle sont utilisées telles que la pancréatine ou des extraits d'intestin de rats [121]. Les temps de transit de l'intestin grêle peuvent aussi être très variables selon les études. En effet, certaines études mettent en contact les formulations avec le fluide intestinal simulé pendant 2 heures [10] tandis que d'autres réalisent cette étape en 9 heures [15]. Le temps de transit simulé dans l'intestin grêle peut être choisi selon les choix des auteurs de vouloir mimer les conditions standards (3h) ou les conditions extrêmes (9h) rencontrées dans certaines pathologies digestives. Le degré

d'agitation est de 100 rpm pour l'appareil à pale et de 5 rpm pour les cylindres alternatifs. Le milieu de dissolution est maintenu à 37°C pour mimer les conditions physiologiques.

Les formulations engendrant une libération de PA trop importante durant les deux premières étapes ne sont souvent pas évaluées dans les conditions coliques car elles ne répondent pas aux objectifs du travail.

c) La simulation des conditions coliques

Les conditions coliques sont souvent simulées par l'utilisation de milieu à pH 7,4. La Pharmacopée Européenne ne recommande aucun milieu spécifique. Néanmoins de nombreuses techniques ont déjà été utilisées. Le temps d'analyse dans les conditions coliques n'est pas standardisé. Il peut s'étendre de 10h [124], 14h [125], 18h [94], [126], [127], 19h [94], [118], [119], [128], [129], 20h[10], à 21h [130] selon les études.

Le tampon Phosphate

Le tampon phosphate pur

Certaines équipes utilisent uniquement le tampon phosphate dont le pH varie de 6,8 to 7,5 [131]–[133]. Cette technique peut être utilisée de manière légitime quand les formulations testées sont du type « temps-dépendant ». Mais certaines études revendiquant de tester des formulations sensibles aux enzymes bactériennes utilisent des milieux simulation du côlon composés uniquement d'un tampon phosphate pH 7,4. Il n'est pas raisonnable de prouver le ciblage colique des formulations par cette méthode qui ne mime qu'un seul critère physique du côlon qui est le pH.

Des microspheres de conjugué de Chitosan et prednisolone ont été enrobées d'Eudragit® L 100 et évaluées *in vitro* à différentes valeurs de pH [134]. Des microsphères enrobées d'Eudragit® sont capables de protéger le PA dans un fluide gastrique simulé mais lorsque le pH augmente jusque 6,8, le taux de libération du PA à partir des microsphères augmente significativement.

Cette technique est très spécifique. En effet, la formulation à libération colique ciblée est généralement utilisée pour traiter les pathologies coliques. Celles-ci sont souvent associées à une perturbation du temps de transit et/ou du pH différents compartiments gastriques et intestinaux (particulièrement dus à des déséquilibres bactériens). Ainsi, simuler le compartiment colique à l'aide d'un tampon phosphate est une méthode trop simpliste dès lors qu'aucune enzyme bactérienne n'est présente.

Le tampon phosphate ne présence d'enzyme de bactérie colique

A partir du moment où les conditions bactériennes ou les enzymatiques coliques veulent être respectées, il est nécessaire que le milieu de dissolution utilisé reste en anaérobiose et cela doit être le cas du début jusqu'à la fin du test de libération. Ainsi, le milieu de libération est positionné dans une chambre anaérobie ou tous récipients qui maintiennent cet environnement. Certaines équipes utilisent le tampon phosphate dans lequel est additionné une seule ou plusieurs enzymes bactériennes normalement présentes dans le côlon [135], [136]. Des enzymes telles que la β -galactosidase [124], [125] est artificiellement ajoutée dans des quantités fixées au hasard. Des comprimés d'acide 5-aminosalicylique enrobés par un mélange d'amylose:EC ont été testés et l'exploitation des enzymes bactériennes intestinales (α -amylase) a été évaluée pour cibler la libération du PA à partir de formulation composée d'amylose [137]. La performance des formulations enrobées d'un mélange d'amylose: EC (ratio 1: 1 et niveau d'enrobage de 15%) a été évaluée *in vitro* avec quatre amylases commerciales et avec des échantillons fécaux frais dans du tampon phosphate [6] (figure 3). D'après les résultats d'études *in vitro*, il a été conclu que l'enrobage composé d'amylose: EC pourrait supprimer la libération précoce de la substance active dans le HTGI en fonction de l'épaisseur d'enrobage mais également du ratio polymère: polymère. Contrairement aux formulations à libération immédiate dans lesquelles la substance active est rapidement libérée et absorbée dans la circulation sanguine, la formulation entérique à libération retardée la libération jusqu'à atteindre l'intestin grêle (la plupart d'entre eux), mais les enrobages à base d'amylose retarde la libération du médicament jusqu'à ce que les minigranules atteignent le côlon.

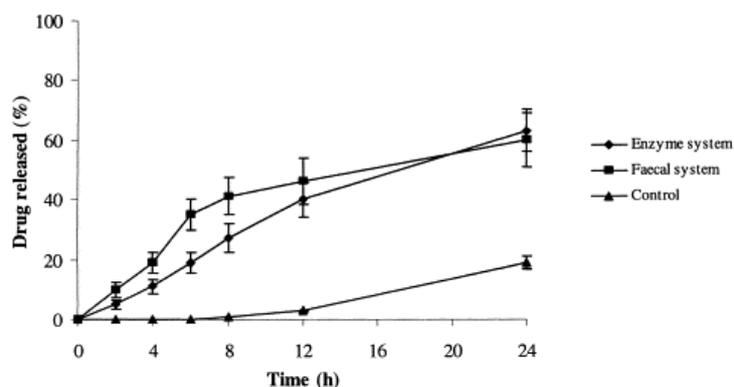


Figure 3: La libération d'acide 5-aminosalicylique à partir de minigranules enrobées d'un mélange d'amylose-éthylcellulose dans des systèmes de fermentation composés d'un milieu de culture (fermentation enzymatique et fécale) et un contrôle (moyenne \pm SD) [6].

Différents travaux ont étudié la libération de substances actives à partir de microsphères entériques enrobées de pectinate de calcium ou de minigranules matricielles combinant la pectine, Eudragit® RS et Eudragit® RL dans un tampon phosphate à pH 7.4 en absence ou en présence de 0.375 mL ou 0.6 mg/mL d'enzymes pectinolytiques [138]–[140]. La libération de SA à partir de billes d'alginate enrobées d'acétate de Dextran [104] était significativement plus rapide en présence de dextranases. L'utilisation d'enzymes qui dégradent spécifiquement l'enrobage de la formulation ou qui clivent les liens des prodrugs est artificielle. En effet, il est certain d'observer une libération de la SA dans ces conditions de simulations des conditions coliques. Aucune étude n'a prouvé la présence et la quantité réellement présente de ces enzymes dans le colon de patients atteints de pathologies digestives. Dans ces études, le pH du milieu choisi est compris entre un pH simulant le colon et le pH optimum d'activité de ces enzymes. Cependant, chez les patients atteints de pathologies digestives, ces enzymes peuvent être présentes en plus faibles quantités, absentes ou inactives à cause de variations de pH digestif.

Tampon phosphate avec du contenu caecal de rats.

Le tampon phosphate inoculé de contenu caecal de rats est souvent utilisé pour mimer les conditions coliques. Pour obtenir un milieu colique artificiel, des rats sont sacrifiés et leur contenu caecal est prélevé. Dans ces études, le milieu contient 2% [10] [118], [129], 3% [94], 4% [124], [128], [141], 8% [142] ou 33% [125], [126] de contenu caecal. Certaines équipes utilisent « l'induction enzymatique » [10], [118], [127]–[130], [141] en imposant un régime alimentaire spécifique aux rats. Ce régime est enrichi ou encore, les rats sont gavés par intubation [94] avec la substance d'intérêt pour laquelle nous voulons observer une dégradation enzymatique. (composant de l'enrobage ou du noyau de la formulation). La modification de l'alimentation entraîne une surproduction d'enzymes dirigées contre la substance d'intérêt. Ainsi, le contenu caecal de rats est enrichi en enzymes, ce qui accélère considérablement la libération de SA de la formulation. Cette méthode est légèrement biaisée et ne correspond pas aux conditions réelles de libération de la SA. Durant la préparation du contenu caecal, des études incluent une étape de passage aux ultrasons [10] pour éliminer les bactéries présentes dans le milieu et ne garder que les enzymes excrétées. Les ultrasons peuvent être utilisés pour atteindre les enzymes bactériennes intracellulaires. De la même manière, cette technique s'éloigne des conditions réelles de libération de la SA pour lesquelles la formulation est en contact avec les bactéries et induit la sécrétion d'enzymes.

Des billes de 5-fluorouracil enrobées de Eudragit® S ont été évaluées pour la libération colique dans le but de réduire les effets indésirables dus à l'absorption de la SA dans le haut tractus gastro-intestinal. Comme attendu, la libération a été supprimée dans un milieu simulant le contenu gastrique et ciblée à pH 7,4. Un comprimé matriciel composé d'un mélange de chitosan et de gomme Guar et enrobé d'inuline (enrobage interne) et de gomme schellac (enrobage externe) [96] a été étudié et la libération de SA a été contrôlée dans les fluides gastriques et intestinaux, et cette libération n'a débuté qu'en présence de contenu caecal de rats. La libération *in vitro* d'indométhacine suite à l'exposition dans du tampon phosphate inoculé ou non de contenu caecal de rats a montré une libération plus rapide de la SA dépendante de l'activité de biodégradation des enzymes bactériennes [143].

Enfin, une étude a aussi utilisé le contenu caecal de chèvre, suivant la même procédure que pour les rats. « La totalité du contenu gastro-intestinal de la chèvre était commercialement recueilli auprès de l'abattoir immédiatement après le sacrifice et était conservé dans une solution physiologique (barboté avec du CO₂ au préalable) à 8°C avant utilisation. 900 ml de ce contenu caecal est disposé dans béccher de l'appareil de dissolution » [144] (Figure 4).

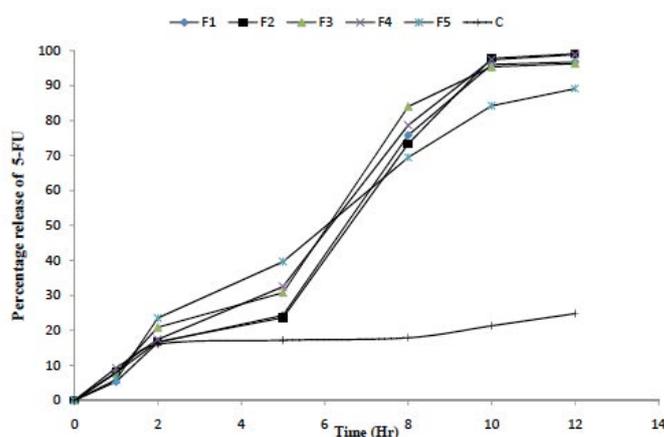


Figure 4: Taux de 5-FU libéré à partir de comprimé enrobés released from compression coated tablets (n=3) of d'amidon de riz *in vitro* avec (F1-F5) ou sans (C) contenu caecal de chèvre [144].

Dans l'étude publiée par Paharia et al. , la libération *in vitro* de SA en présence de contenu caecal de rat a montré qu'il n'y avait pas ou peu de différence entre les profils de libération en présence ou en absence de ce contenu [10].

Tampon phosphate avec des selles fraîches de rats

D'autres études utilisent des selles de rats à la place de contenu caecal [145]. Ces selles contiennent les bactéries représentatives de la population bactérienne colique et sont

faciles à obtenir. Cependant, les selles sont plus sèches et peuvent avoir un pH différent de celui du contenu caecal, ce qui peut entraîner des modifications, voire une diminution de la variété de la population bactérienne si le prélèvement et l'utilisation de la selle ne se font pas assez rapidement. Les techniques utilisant des contenus caecaux ou des selles d'animaux sont intéressantes et relativement faciles à mettre en œuvre, cependant, elles restent éloignées des conditions physiologiques de libération de SA. La microflore colique humaine est différente de celle observée chez les animaux. Les nutriments et les enzymes présents dans le côlon doivent aussi différer entre les Hommes et les animaux. Ainsi, cette méthode n'est toujours pas la plus adaptée pour simuler les conditions coliques humaines parce que la microflore est spécifique du genre et très différente selon les espèces et les humains.

Tampon phosphate avec des échantillons fécaux frais humains.

Des minigranules d'acide 5-aminosalicylique enrobées avec un mélange d'amylose :ethylcellulose (EC) au ratio 1:4 (w/w) ont montré une résistance aux fluides gastriques et intestinaux mais un caractère fermentescible par les enzymes bactériennes coliques [68]. Dans cette étude, une préparation d'échantillon fécal était homogénéisée dans un tampon phosphate anaérobie à pH 7,0, et après centrifugation, le supernatant sans cellule était utilisé pour tester la libération de SA contenu dans des formulations. Basit et al. ont évalué la libération colique de minigranules chargées en théophylline enrobées avec un mélange d'amylose:ethylcellulose au ratio 1:3 et un niveau d'enrobage de 20% [146]. L'étude de la libération *in vitro* était réalisée dans un milieu simulant le colon consistant en 3 échantillons fécaux de volontaires sains prélevés, mis en commun et dilués à 10% avec un tampon phosphate à pH 6,8. (Figure 5).

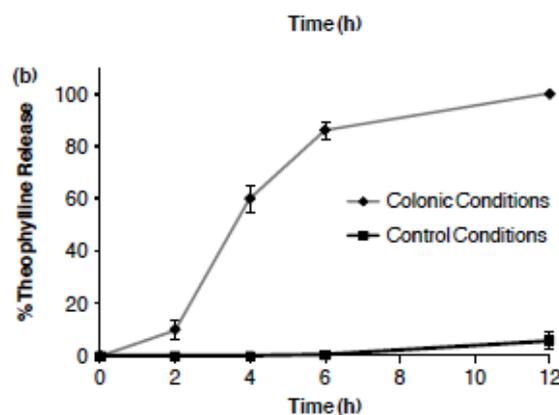


Figure 5: La libération *in vitro* de la théophylline dans des conditions témoin (tampon phosphate à pH 6,8) et les conditions coliques (tampon phosphate à pH 6,8 ensemencé avec 10% en poids / poids de matières fécales humaines).

Ces méthodes utilisent des selles de volontaires sains, ainsi, elles ne sont pas les plus adaptées pour simuler la libération colique de SA. Les patients souffrant de pathologies coliques ont potentiellement une flore bactérienne, un pH ou un temps de transit modifié.

Le tampon phosphate n'est pas un milieu de culture, aucune croissance bactérienne ne s'y produit mais seules les enzymes déjà présentes peuvent agir. Cependant, les enzymes capables de cliver les polysaccharides sont souvent inductibles (ceci est bien connu pour le genre *Bacteroides*). L'induction n'a pas lieu sans croissance bactérienne.

Milieu de culture

Milieu de culture avec des selles fraîches de rats

Parfois, un milieu de culture est utilisé pour faciliter la croissance bactérienne et la production d'enzymes. Dans l'étude de Sharma R. et al., le milieu de culture était inoculé par des selles de rats pour cultiver les bactéries coliques présentes dans les selles et étudier la libération de SA à partir de pro-médicaments par l'action d'azoreductase [147]. Le milieu de culture doit être adapté au genre bactérien prédominant trouvé dans les selles humaines, ce qui n'est pas retrouvé systématiquement dans la littérature.

Milieu de culture inoculé avec des cultures pures de bactéries du côlon humain

Certaines études utilisent un milieu de dissolution consistant en un milieu de culture inoculé avec une ou plusieurs souches bactériennes présentes dans le colon humain. LA bactérie utilisée doit être capable de se développer dans des conditions d'anaérobie, être présentes en grande quantité dans le côlon et doivent avoir préférentiellement un faible potentiel pathogène. Araujo V. et al. ont utilisé par exemple une souche d'*Escherichia coli* cultivée dans un milieu Luria-Bertani Broth [148]. Le choix de l'*E. coli* peut être biaisé parce que cette souche se développe dans des conditions d'aérobie et d'anaérobie, ainsi, sa culture est facilitée (particulièrement dans les études où le test de libération est mené sous conditions aérobies avec un milieu approprié) et son potentiel de dégradation des polysaccharides d'enrobage est important et connu.

Milieu de culture inoculé avec un échantillon de selles fraîches humaines

Pour se rapprocher le plus des conditions physiologiques humaines, des selles fraîches d'Hommes sains peuvent être utilisées [121]. L'utilisation de la totalité de la selle permet de tester l'action du mélange bactérien présent dans celle-ci. Les interactions entre les bactéries sont possibles, la croissance d'un type peut favoriser le développement des autres. Pour imiter

fidèlement les conditions coliques des patients traités par des formulations de SA à libération colique, les selles de patients souffrant de pathologies digestives telles que les MICI peuvent être utilisées [121]. Y.Karrout et al. [7], [15] ont étudié des minigranules enrobées de films composés de mélanges d'Eurylon 6 HP-PG:ethylcellulose ou de Nutriose:ethylcellulose (un amidon riche en amylose hydroxypropylé et pré-gélatinisé) dans un milieu de culture inoculé de selles fraîches de patients atteints de MICI (Figure 6). La conclusion de cette étude était que les systèmes galéniques de libération de SA étudiés étaient adaptés aux conditions physiopathologiques des patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin.

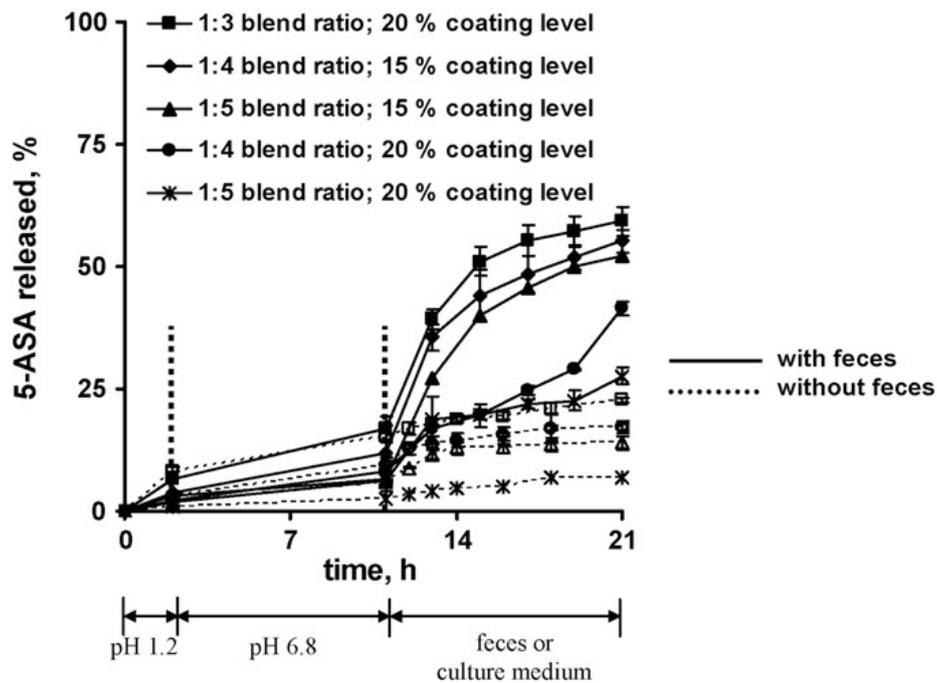


Figure 6: La libération de 5-ASA à partir de minigranules enrobées d'un mélange Nutriose:ethylcellulose (les ratio sont indiqué dans la figure) à 15 ou 20% de niveau d'enrobage dans des conditions simulant le transit à travers le tractus gastrointestinal complet, avec des échantillons de selles de patients atteints de MICI. La vitesse d'immersion était de 10 rpm. Pour des raisons de comparaison, la libération de la SA dans un milieu de culture sans échantillons fécaux est représentée (lignes pointillées) [15].

Les échantillons de selles doivent être placés sous atmosphère anaérobie et être utilisés le plus tôt possible après le prélèvement pour maintenir la microflore colique intacte. La dégradation de la SA par la flore colique luminale a été évaluée Tannergren C. et al [149]. Dans cette étude, des selles fraîches d'humains, rats et chiens ont été utilisées et placées dans une chambre d'atmosphère anaérobie dans les 10 et 30 minutes après le prélèvement. Ces selles étaient préparées dans un tampon salin physiologique et incubées dans une chambre d'atmosphère anaérobie sous agitation.

La méthode, qui semble être la plus réaliste, est l'utilisation de milieux de culture inoculés de selles fraîches de patients, ce qui recrée le milieu de dissolution le plus similaire au milieu colique humain. Les bactéries présentes dans les selles fraîches humaines sont celles qui sont retrouvées en plus grandes quantités dans le côlon. Le milieu de culture utilisé doit représenter la composition en nutriment de l'environnement colique mais aussi d'autres composants tels que les mucines présentes dans la lumière du côlon.

3. Le système de culture en continu : l'exemple du SHIME

Il y a des systèmes très complexes simulant la totalité du TGI de la bouche jusqu'au côlon. Ces systèmes peuvent mimer l'environnement des divers compartiments du TGI avec leurs spécificités de pH, de composition en nutriments, d'enzymes et bactériennes. Le Simulateur de l'écosystème microbien intestinal humain (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem : le système SHIME) en est un exemple. Ce simulateur consiste en un écosystème, un modèle dynamique validé scientifiquement composé de 5 réacteurs simulant séquentiellement l'estomac, l'intestin grêle, et les trois régions du gros intestin (le colon ascendant, transverse et descendant). Un contrôle des paramètres environnementaux permet d'obtenir une communauté bactérienne complexe et stable, se rapprochant de la structure et de la fonction physiologique de la microflore gastro-intestinale. L'échantillon fécal d'un donneur sain est inoculé dans le modèle (Figure 7).

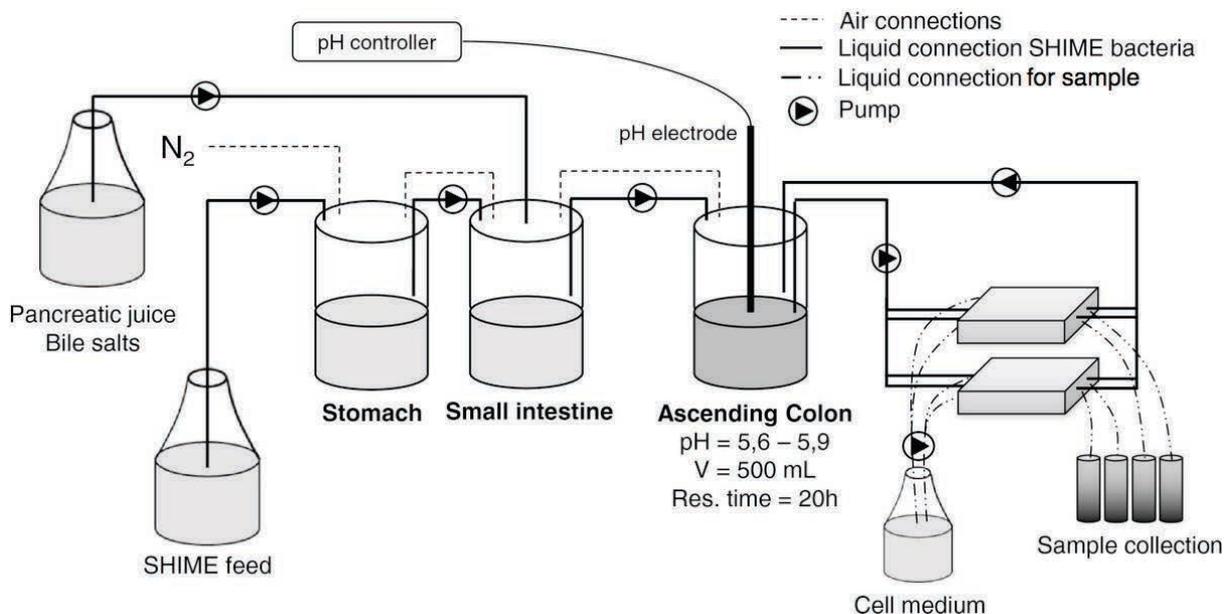


Figure 7: Schéma du système SHIME

Ce système permet d'étudier le sort métabolique de composés alimentaires ou de produits pharmaceutiques dans le tube digestif. Le grand inconvénient de cette méthode est son temps d'équilibration. En effet, il requiert deux semaines de stabilisation [150]. Le dénombrement de la flore totale anaérobie était de $1.1 \cdot 10^8$ UFC. mL⁻¹, et aérobie $2.25 \cdot 10^7$ UFC. mL⁻¹ incluant les entérobactéries, les bifidobactéries, les enterocoques, les staphylocoques et les clostridia. Cette digestion colique était maintenue à pH compris entre 5,9 et 6,3, comme observé dans le colon ascendant humain, incubé à 37°C et agité à 150 rpm durant 18 heures. L'atmosphère du SHIME était régulièrement remplacé par de l'azote gazeux pour maintenir des conditions d'anaérobioses. Ce système peut être utilisé pour évaluer l'activité prébiotique des substances [151], [152]. Dans cette étude, le récipient mimant le côlon dans le système SHIME était inoculé avec un échantillon de selle d'un jeune adulte volontaire mâle sans traitement antibiotique ou désordre colique depuis 6 mois. L'échantillon fécale est dilué et homogénéisé avec un tampon phosphate. Après la phase de stabilisation, les compartiments du côlon ont subi un pré-traitement au fructose et les effets sur la flore bactérienne ont été étudiés.

Ce simulateur est largement utilisé pour étudier les effets de régimes particuliers ou de traitements médicamenteux sur la microflore intestinale ou inversement, pour étudier la libération de SA à partir de formulation par l'action bactérienne dans le compartiment digestif. Ce système est très complexe. L'environnement de chaque compartiment peut être très différent selon les études et une harmonisation serait difficile à mettre en œuvre. De plus, il est difficile de simuler un contenu gastrique standard. Celui-ci reste très différent entre les différents individus et à différents moments de la journée. La fixation d'une composition du contenu gastrique peut avoir un effet inverse, c'est-à-dire de s'éloigner des conditions physiologiques.

Il existe des dérivés du système SHIME avec des simplifications, un nombre réduit de réacteurs [153], [154] ou plus complet avec par exemple le Twin SHIME [155] dans lequel deux systèmes SHIME sont utilisés en parallèle pour comparer différents produits entre eux ou avec un placebo.

Les inconvénients de ce système complexe sont l'utilisation d'une seule selle fraîche et la longue période de stabilisation. La communauté bactérienne sera sélectionnée par les substrats introduits dans les réacteurs qui ne sont pas les mêmes que les substrats complexes ingérés dans l'alimentation humaine.

IV. Les méthodes *In vivo*

1. Les modèles animaux

Les modèles animaux pour les études de libération de SA à administration orale sont nombreux et peuvent aller de la souris à la chèvre en passant par le rat ou le chien [115]. Ces modèles peuvent être sélectionnés selon la SA à étudier, la formulation ou le compartiment digestif ciblé. IL existe des modèle d'animaux sains et des modèles d'animaux souffrant de pathologies digestives, telles que des colites induites par le TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzene sulfonique) [145]. L'administration de la formulation à l'animal peut être réalisée directement à travers l'alimentation ou par une canule ou une sonde d'alimentation directement dans l'estomac. Après l'administration, il existe différentes méthodes d'étude de la libération de la SA.

Les animaux peuvent recevoir un prétraitement qui induit la production d'enzymes qui améliore la libération de la SA de la formulation. Les rats peuvent par exemple recevoir un prétraitement consistant en une dispersion de pectine, une fois par jour pendant 7 jours avant l'administration d'une formulation enrobée de pectine et d'ethylcellulose [116], [124].

L'évaluation de la libération *in vivo* de SA dans le colon animal peut être étudié par de nombreuses techniques telles que la coeliotomie, l'étude de la cinétique plasmatique, la surveillance des caractéristiques histopathologiques ou les techniques d'imagerie.

a) Coeliotomie

La coeliotomie peut être utilisée pour évaluer le transit gastro-intestinal. Le transit des formulations peut être évalué en comptant le nombre de formulations présentes dans l'estomac après un temps défini [116]. Cette technique requiert le sacrifice de nombreux animaux, c'est pourquoi ce n'est pas la technique de référence pour l'étude de la libération de SA.

b) Etude cinétique plasmatique

Les prélèvements sanguins à des temps réguliers peuvent être réalisés chez l'animal et le dosage de la SA peut déterminer la quantité de médicament libérée et absorbée [40], [115]. Cette technique possède l'avantage de permettre la mesure de la quantité de SA absorbée. En effet, la SA peut être libérée dans le tube digestif mais ne pas être absorbée et ne pas atteindre le sang. La quantité limite de SA dosée dans le sang serait celle des techniques analytiques utilisées. Les méthodes chromatographiques séparatives sont utilisées pour déterminer la

concentration de SA dans un milieu complexe tel que le sang ou le plasma. Cependant, ces techniques ne sont pas toujours très sensibles et leur limite de quantification de la SA est souvent plus haute que la concentration présente dans *in vivo*. Des techniques plus sophistiquées et moins accessibles existent telles que la spectrométrie de masse et sont souvent requises pour réaliser de telles études. Une autre limitation peut être la dégradation enzymatique par les enzymes plasmatiques ou intestinales qui transforment la molécule médicamenteuse avant son absorption à travers la paroi digestive.

c) Caractères histopathologiques

La surveillance de l'évolution de la pathologie, des symptômes, du poids de l'animal, peut permettre d'évaluer la libération de la SA [145]. L'évolution de la pathologie peut aussi être étudiée par l'observation de l'évolution des paramètres biochimiques ou histologiques tels que le dosage de cytokines ou de marqueurs.

Les paramètres histopathologiques peuvent être étudiés après l'euthanasie de l'animal avec des études microscopiques. Cette technique requiert le sacrifice d'animaux, ce n'est donc pas la technique de référence pour l'analyse de la libération de SA à partir de formulation. Les résultats de ces techniques ont l'avantage de pouvoir être analysés en aveugle pour éviter la subjectivité

d) L'imagerie

L'imagerie à rayons X ou aux molécules radiomarquées [156] peut être utilisée pour suivre l'évolution de la libération de la SA. L'utilisation de l'outil d'imagerie requiert des équipements spéciaux, innovants et coûteux mais également une formation et une compétence particulière.

Des microparticules composées d'un mélange de Chitosan-Ca-alginate ont été préparées et caractérisées pour libérer l'acide 5-aminosalicylique au niveau du côlon après une administration orale [157]. Les études de dissolution et de biodistribution d'acide 5-aminosalicylique marqué à l'iode 131 après administration orale de ces particules par des rats a montré une intensive mucoadhésion et une libération contrôlée au niveau du colon [158].

L'inconvénient de cette méthode est l'utilisation de l'imagerie chez de petits animaux, ce qui rend la technique peu précise et il est difficile de différencier une libération colique d'une libération iléale.

Les tests *in vivo* chez l'animal associent souvent plusieurs méthodes d'analyses préalablement décrites. Y.Karrouf et al. [159] ont prouvé la supériorité d'un enrobage sensible aux enzymes bactériennes, composé d'un mélange de Nutriose:EC et d'amidon de maïs:EC utilisé pour cibler la libération de SA au niveau du colon *in vivo*, dans un modèle de rat et de souris. Diverses méthodes ont été utilisées pour tester l'efficacité de ces nouvelles formulations telles que l'évaluation macroscopique et histologique la surveillance des marqueurs inflammatoires, l'analyse PCR en temps réel de HMGCS2 mRNA et PPAR- γ mRNA, le taux plasmatique de N-acetyl 5-ASA et la surveillance de l'activation de PPAR- γ (Figure.8).

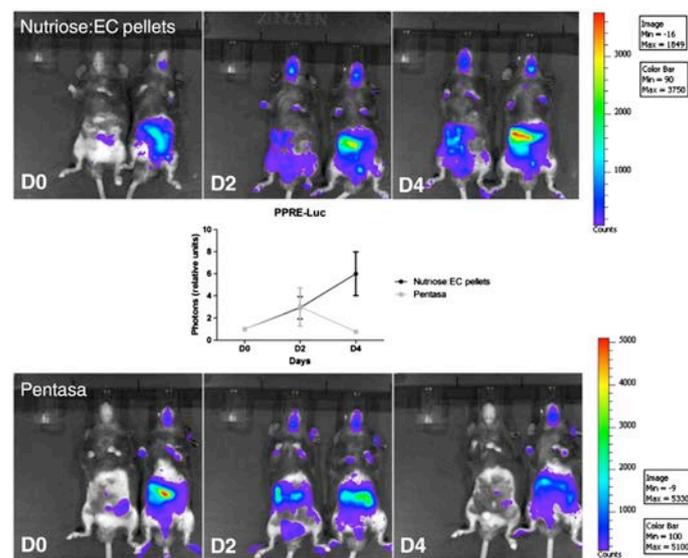


Figure 8: Activation *in vivo* de PPAR γ chez les souris transgéniques recevant des minigranules enrobés de Nutriose: CE ou le Pentasa® oralement pendant 4 jours. L'activation du récepteur a été mesurée par émission de bioluminescence à jour 0 (J0), le jour 2 (D2) et après 4 jours (D4). L'échelle de couleur indique le degré d'activation. Les deux mêmes animaux sont présentés par colonne dans chaque image. Le diagramme trace les quantités relatives des photons émis en fonction du temps pour les deux groupes de souris [159].

Toutes ces techniques sont destinées à prouver la libération de la SA dans le côlon et démontrer l'efficacité anti-inflammatoire du médicament.

Les modèles animaux constituent une inévitable étape dans la modélisation du côlon mais d'importantes différences existent entre la microflore colique de l'homme et de l'animal. Alors que chez les humains, les bifidobactéries et Bacteroides prédominent, les lactobacilles

se trouvent généralement à des niveaux élevés sur la muqueuse intestinale des souris et des rats. Ils affichent également des niveaux élevés de glycosidases, mais la structure et l'activité de ces enzymes ne sont pas bien connues et différent du microbiote colique humain.

2. Les méthodes *in vivo* chez l'Homme

Des essais cliniques sur des volontaires sains et des patients souffrant de pathologies digestives sont difficiles à mettre en œuvre à cause d'une législation stricte. Des demandes d'autorisation doivent être menées pour l'élaboration d'essais cliniques chez l'Homme auprès des autorités de santé, avec un passage devant le Comité de Protection des Personnes (CPP). De plus, la formulation à délivrer pour l'essai clinique doit être formulée dans un établissement pharmaceutique et non dans un laboratoire de recherche. Ainsi, des collaborations avec des industries pharmaceutiques sont bénéfiques pour permettre d'atteindre un niveau d'évaluation des formulations. C'est pourquoi peu d'études *in vivo* sur le ciblage colique sont déjà décrites.

a) Dosages dans des fluides ou contenus physiologiques

Le sang, le sérum, l'urine, le contenu intestinal ou encore les selles peuvent être obtenus de volontaires sains [160] ou de patients souffrant de pathologies gastro-intestinales pour étudier les paramètres pharmacocinétiques de SA administrées.

Une formulation qui permet d'améliorer la libération contrôlée ciblée d'une forme à administration orale de métsulfobenzoate de sodium de prednisolone dans le côlon a été développée dans le but de diminuer l'absorption systémique et par conséquent réduire le risque d'effets indésirables systémiques des corticostéroïdes. La formulation est composée de métsulfobenzoate de sodium de prednisolone enrobée d'un mélange d'amylose vitreux:EC (ratio 1:3.5 à 1:4.5) plastifié avec du dibutyl sebacate [161]. La formulation a montré une libération débutant lorsque la formulation atteint le côlon. Un enrobage composé du mélange amylose vitreux :EC est maintenant disponible et correspond COLAL®, qui a été utilisé pour enrober des minigranules contenant de la prednisolone (COLAL-PRED®; Alizyme Therapeutics Ltd, Cambridge, UK). Ce produit a atteint avec succès la phase II [162] d'un essai clinique pour le traitement des colites ulcéraives sévères.

L'utilisation du dosage de la SA dans des fluides biologiques est relativement facile à mettre en œuvre mais cette technique ne matérialise pas la localisation exacte de la libération de la SA. La SA libérée dans l'intestin grêle ou dans le côlon peut atteindre le compartiment sanguin au même temps si le temps de transit est perturbé.

b) Radiographie et scintigraphie

Des molécules marquées pour l'imagerie aux rayons X peuvent être formulées à l'intérieur des formes orales administrées pour suivre l'évolution de la libération de la SA [117]. Des molécules marquées avec un isotope radioactif peuvent être utilisées dans des formulations à administration orale pour suivre l'évolution de la libération par des images de scintigraphie [12], [113], [163] (Figure 9). La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale qui procède en l'administration d'un isotope radioactif pour produire une image par détection des rayonnements γ émis par ces isotopes après captation par l'organe analysé. L'avantage de la scintigraphie est l'observation de la libération de la SA à partir de la formulation dans des conditions physiologiques normales avec une technique non invasive. La difficulté de cette technique est de trouver une molécule qui puisse être marquée (qui peut être détectée durant l'examen de scintigraphie), qui se comporte de la même manière que la SA d'intérêt, c'est-à-dire qui possède les mêmes propriétés physicochimiques.

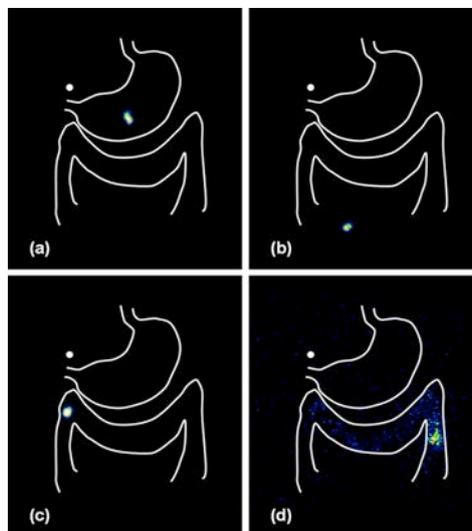


Figure 9: Images de scintigraphie d'événements clés dans le transit gastro-intestinal de l'absorption d'un comprimé réservoir chez le sujet 003: (a) 60 min, comprimé situé dans l'estomac; (b) 180 min, comprimé dans l'intestin grêle; (c) 330 min (début de libération du marqueur radioactif, comprimé dans le colon ascendant / côlon transverse) et (d) 765 min (libération complète du marqueur radioactif, comprimé dans le côlon descendant). Les contours de l'estomac et du côlon sont tracés pour l'aide à la visualisation. Le cercle blanc représente le marqueur radioactif sur la poitrine du sujet [164].

L'utilisation des gamma-caméras a permis d'étudier la désintégration de comprimés enrobés de Pectine dans le côlon [12]. Des mélanges de pectine/chitosan et HPMC ont été étudiés comme films d'enrobage de système à libération colique, formant *in situ*, des complexes polyelectrolyte entre la pectine et le chitosan [88]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées en utilisant de tels systèmes. Des comprimés marqués (^{99m}Tc) ont été enrobés avec

un mélange au ratio 3:1:1, pectine:chitosan: hydroxypropyl methylcellulose, et administrés à des volontaires sains et le transit gastro-intestinal a été étudié par images de scintigraphie. Une formulation composée de gomme Guar a été évaluée sur des volontaires sains par études scintigraphiques [101].

Les méthodes d'imagerie permettent une visualisation et la localisation de la libération de la SA. Cependant, ces techniques doivent être associées avec des dosages sanguins, la surveillance de l'évolution des symptômes et éventuellement des études des effets de la formulation sur la microflore bactérienne colique.

V. Conclusion

Différentes stratégies sont utilisées pour cibler la libération de la SA dans le colon mais l'utilisation de formulations sensibles aux enzymes bactériennes de la microflore colique semble la plus spécifique. Les méthodes utilisées pour tester la libération de ces formulations sont nombreuses et diverses. M.M.Patel [16] décrit, dans sa revue de la littérature concernant la libération ciblée de traitement de cancer colorectal, les formulations récemment développées selon la technologie utilisée : enrobage dépendant du pH, dépendant du temps mais principalement les formulations sensibles aux enzymes bactériennes. Dans cette revue, M.M.Patel décrivait les différentes méthodes de test de libération utilisées. L'utilisation de bactérie colique ou d'enzymes bactériennes coliques apparaît être essentielle pour simuler le compartiment colique et montre la spécificité des formulations à libération colique. Il est essentiel d'intégrer un aspect bactériologique (dénombrement bactérien ou identification) dans ces recherches galéniques sur le ciblage colique de SA car la plus grande particularité du côlon est son microbiote spécifique et diverse. Les Pharmacopées ne décrivent pas de méthodes standards. Cependant, une homogénéisation des pratiques permettrait de pouvoir comparer les résultats de tests de libération de différentes formulations médicamenteuses et d'aider au développement de nouvelles thérapeutiques.

VI. References

- [1] N.-A. Peppas, « Vecteurs de médicaments innovants et “intelligents” : leurs applications pharmaceutiques », févr. 2008.
- [2] A. A. El-Bary, A. A. Aboelwafa, et I. M. Al Sharabi, « Influence of some formulation variables on the optimization of pH-dependent, colon-targeted, sustained-release mesalamine microspheres », AAPS PharmSciTech, vol. 13, no 1, p. 75-84, mars 2012.
- [3] A. Gazzaniga, A. Maroni, M. E. Sangalli, et L. Zema, « Time-controlled oral delivery systems for colon targeting », Expert Opin. Drug Deliv., vol. 3, no 5, p. 583-597, sept. 2006.
- [4] P. Liu et T. R. Krishnan, « Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation », J. Pharm. Pharmacol., vol. 51, no 2, p. 141-149, févr. 1999.
- [5] M. A. Peppercorn et P. Goldman, « The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine », J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 181, no 3, p. 555-562, juin 1972.
- [6] L. F. Siew, S.-M. Man, J. M. Newton, et A. W. Basit, « Amylose formulations for drug delivery to the colon: a comparison of two fermentation models to assess colonic targeting performance *in vitro* », Int. J. Pharm., vol. 273, no 1-2, p. 129-134, avr. 2004.
- [7] Y. Karrout, C. Neut, F. Siepmann, D. Wils, P. Ravaux, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, M. Lemdani, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Enzymatically degraded Eurylon 6 HP-PG: ethylcellulose film coatings for colon targeting in inflammatory bowel disease patients », J. Pharm. Pharmacol., vol. 62, no 12, p. 1676-1684, déc. 2010.
- [8] J. Varshosaz, J. Emami, F. Ahmadi, N. Tavakoli, M. Minaiyan, A. Fassihi, P. Mahzouni, et F. Dorkoosh, « Preparation of budesonide-dextran conjugates using glutarate spacer as a colon-targeted drug delivery system: *in vitro/in vivo* evaluation in induced ulcerative colitis », J. Drug Target., vol. 19, no 2, p. 140-153, févr. 2011.
- [9] L. Hovgaard et H. Brøndsted, « Current applications of polysaccharides in colon targeting », Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., vol. 13, no 3-4, p. 185-223, 1996.
- [10] A. Paharia, A. K. Yadav, G. Rai, S. K. Jain, S. S. Pancholi, et G. P. Agrawal, « Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting », AAPS PharmSciTech, vol. 8, no 1, p. 12, 2007.
- [11] S. Davaran, J. Hanaee, et A. Khosravi, « Release of 5-amino salicylic acid from acrylic type polymeric prodrugs designed for colon-specific drug delivery », J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 58, no 3, p. 279-287, avr. 1999.
- [12] M. Ashford et J. T. Fell, « Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration », J. Drug Target., vol. 2, no 3, p. 241-257, 1994.
- [13] G. Van den Mooter, « Colon drug delivery », Expert Opin. Drug Deliv., vol. 3, no 1, p. 111-125, déc. 2005.

- [14] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Characterization of ethylcellulose: starch-based film coatings for colon targeting », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 35, no 10, p. 1190-1200, oct. 2009.
- [15] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [16] M. M. Patel, « Getting into the colon: approaches to target colorectal cancer », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no 9, p. 1343-1350, sept. 2014.
- [17] R. Kinget, W. Kalala, L. Vervoort, et G. van den Mooter, « Colonic drug targeting », *J. Drug Target.*, vol. 6, no 2, p. 129-149, 1998.
- [18] A. Maroni, L. Zema, M. D. Del Curto, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, no 0.
- [19] M. Brunner, E. Lackner, P. S. Exler, H. C. De Fluiter, K. Kletter, M. Tschurlovits, R. Dudczak, H.-G. Eichler, et M. Müller, « 5-aminosalicylic acid release from a new controlled-release mesalazine formulation during gastrointestinal transit in healthy volunteers », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no 1, p. 137-144, janv. 2006.
- [20] A. Yarlal, L. Yen, et P. Hodgkins, « The relationship among multiple patient-reported outcomes measures for patients with ulcerative colitis receiving treatment with MMX(®) formulated delayed-release mesalamine », *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.*, sept. 2014.
- [21] S. P. L. Travis, E. F. Stange, M. Lémann, T. Oresland, Y. Chowers, A. Forbes, G. D'Haens, G. Kitis, A. Cortot, C. Prantera, P. Marteau, J.-F. Colombel, P. Gionchetti, Y. Bouhnik, E. Tiret, J. Kroesen, M. Starlinger, N. J. Mortensen, et European Crohn's and Colitis Organisation, « European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management », *Gut*, vol. 55 Suppl 1, p. i16-35, mars 2006.
- [22] M. Y. Hu et M. A. Peppercorn, « MMX mesalamine: a novel high-dose, once-daily 5-aminosalicylate formulation for the treatment of ulcerative colitis », *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 9, no 6, p. 1049-1058, avr. 2008.
- [23] L. P. H. Yang et P. L. McCormack, « MMX® Mesalazine », *Drugs*, vol. 71, no 2, p. 221-235, janv. 2011.
- [24] M. Xu, M. Sun, H. Qiao, Q. Ping, et E. S. Elamin, « Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 165-171, juill. 2014.
- [25] A. M. J. Newton et P. Lakshmanan, « Effect of HPMC - E15 LV premium Polymer on Release Profile and Compression Characteristics of Chitosan/ Pectin Colon Targeted Mesalamine Matrix Tablets and *in vitro* Study on Effect of pH Impact on the Drug Release Profile », *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 8, no 1, p. 46-62, avr. 2014.
- [26] S. P. L. Travis, S. Danese, L. Kupcinskis, O. Alexeeva, G. D'Haens, P. R. Gibson, L. Moro, R. Jones, E. D. Ballard, J. Masure, M. Rossini, et W. J. Sandborn, « Once-daily budesonide MMX in active, mild-to-moderate ulcerative colitis: results from the randomised CORE II study », *Gut*, vol. 63, no 3, p. 433-441, mars 2014.

- [27] K. Farkas et T. Molnár, « Novel extended release budesonide formulation for treatment of ulcerative colitis », *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 15, no 1, p. 131-137, janv. 2014.
- [28] A. K. De, P. Bhattacharya, S. Datta, et A. Mukherjee, « Evaluation of *in vivo* efficacy and toxicity of prednisolone-loaded hydrogel-based drug delivery device », *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 3, no 4, p. 225-233, oct. 2013.
- [29] L. Pastorelli, S. Saibeni, L. Spina, C. Signorelli, G. Celasco, R. De Franchis, et M. Vecchi, « Oral, colonic-release low-molecular-weight heparin: an initial open study of Parnaparin-MMX for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 28, no 5, p. 581-588, sept. 2008.
- [30] A. Roda, « A new oral formulation for the release of sodium butyrate in the ileo-cecal region and colon », *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no 7, p. 1079, 2007.
- [31] R. Sareen, K. Nath, N. Jain, et K. L. Dhar, « Curcumin Loaded Microsponges for Colon Targeting in Inflammatory Bowel Disease: Fabrication, Optimization, and *In Vitro* and Pharmacodynamic Evaluation », *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. e340701, juill. 2014.
- [32] R. Sareen, N. Jain, A. Rajkumari, et K. L. Dhar, « pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation », *Drug Deliv.*, avr. 2014.
- [33] E. Viennois, B. Xiao, S. Ayyadurai, L. Wang, P. G. Wang, Q. Zhang, Y. Chen, et D. Merlin, « Micheliolide, a new sesquiterpene lactone that inhibits intestinal inflammation and colitis-associated cancer », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 94, no 9, p. 950-965, sept. 2014.
- [34] G. Rai, A. K. Yadav, N. K. Jain, et G. P. Agrawal, « Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon », *Drug Deliv.*, p. 1-10, mai 2014.
- [35] A. Bose, A. Elyagoby, et T. W. Wong, « Oral 5-fluorouracil colon-specific delivery through *in vivo* pellet coating for colon cancer and aberrant crypt foci treatment », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 178-186, juill. 2014.
- [36] A. Casadó, M. L. Sagristá, et M. Mora, « Formulation and *In Vitro* Characterization of Thermosensitive Liposomes for the Delivery of Irinotecan », *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no 10, p. 3127-3138, oct. 2014.
- [37] B. Ghalandari, A. Divsalar, A. A. Saboury, et K. Parivar, « The new insight into oral drug delivery system based on metal drugs in colon cancer therapy through β -lactoglobulin/oxali-palladium nanocapsules », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 140C, p. 255-265, août 2014.
- [38] P. Bhatt, N. Khatri, M. Kumar, D. Baradia, et A. Misra, « Microbeads mediated oral plasmid DNA delivery using polymethacrylate vectors: an effectual groundwork for colorectal cancer », *Drug Deliv.*, avr. 2014.
- [39] T. Plyduang, L. Lomlim, S. Yuenyongsawad, et R. Wiwattanapatapee, « Carboxymethylcellulose-tetrahydrocurcumin conjugates for colon-specific delivery of a novel anti-cancer agent, 4-amino tetrahydrocurcumin », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*

- [40] L. Jin, Y. Ding, M. Feng, et Q. Cao, « Preparation oral levofloxacin colon-specific microspheres delivery: *in vitro* and *in vivo* studies », *Drug Deliv.*, p. 1-7, juin 2014.
- [41] C. Caddeo, A. Nácher, O. Díez-Sales, M. Merino-Sanjuán, A. M. Fadda, et M. Manconi, « Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin », *J. Microencapsul.*, p. 1-6, juin 2014.
- [42] S. Dhaneshwar, M. Kusurkar, S. Bodhankar, et G. Bihani, « Carrier-linked mutual prodrugs of biphenylacetic acid as a promising alternative to bioprecursor fenbufen: design, kinetics, and pharmacological studies », *Inflammopharmacology*, vol. 22, no 4, p. 235-250, août 2014.
- [43] A. Mooranian, R. Negrulj, S. Mathavan, J. Martinez, J. Sciarretta, N. Chen-Tan, T. Mukkur, M. Mikov, M. Lalic-Popovic, M. Stojančević, S. Golocorbin-Kon, et H. Al-Salami, « Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics », *J. Pharm. Innov.*, vol. 9, p. 150-157, 2014.
- [44] M. M. Patel, « Colon targeting: an emerging frontier for oral insulin delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no 6, p. 731-739, juin 2013.
- [45] S. Jose, K. Dhanya, T. A. Cinu, et N. A. Aleykutty, « Multiparticulate system for colon targeted delivery of ondansetron », *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no 1, p. 58-64, janv. 2010.
- [46] G. Z. Abdullah, M. F. Abdulkarim, M. Chitneni, A. F. Mutee, O. Z. Ameer, I. M. Salman, et A. M. Noor, « Preparation and *in vitro* evaluation of mebeverine HCl colon-targeted drug delivery system », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 16, no 4, p. 331-342, avr. 2010.
- [47] H. Kim, Y. Lee, H. Yoo, J. Kim, H. Kong, J.-H. Yoon, Y. Jung, et Y. M. Kim, « Synthesis and evaluation of sulfate conjugated metronidazole as a colon-specific prodrug of metronidazole », *J. Drug Target.*, vol. 20, no 3, p. 255-263, avr. 2012.
- [48] A. Tursi, G. Brandimarte, et R. Daffinà, « Long-term treatment with mesalazine and rifaximin versus rifaximin alone for patients with recurrent attacks of acute diverticulitis of colon », *Dig. Liver Dis.*, vol. 34, no 7, p. 510-515, juill. 2002.
- [49] C. Favier, C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J. F. Colombel, et J. Mizon, « Fecal β -D-Galactosidase Production and Bifidobacteria Are Decreased in Crohn's Disease », *Dig. Dis. Sci.*, vol. 42, no 4, p. 817-822, avr. 1997.
- [50] J. Fu, B. Wei, T. Wen, M. E. V. Johansson, X. Liu, E. Bradford, K. A. Thomsson, S. McGee, L. Mansour, M. Tong, J. M. McDaniel, T. J. Sferra, J. R. Turner, H. Chen, G. C. Hansson, J. Braun, et L. Xia, « Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no 4, p. 1657-1666, avr. 2011.
- [51] P. Seksik, « Microbiote intestinale et MICI », *Gastroentérologie Clin. Biol.*, vol. 34, no 4, p. 48-55, sept. 2010.
- [52] A. Van Gossum, « Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) », *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 21, no 2, p. 81-84, juin 2007.

- [53] T. Mitsuoka, « Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. », *Biosci. Microflora*, vol. 19, no 1, p. 15-25, 2000.
- [54] S. K. Linden, P. Sutton, N. G. Karlsson, V. Korolik, et M. A. McGuckin, « Mucins in the mucosal barrier to infection », *Mucosal Immunol.*, vol. 1, no 3, p. 183-197, mars 2008.
- [55] D. Garrido, J. H. Kim, J. B. German, H. E. Raybould, et D. A. Mills, « Oligosaccharide Binding Proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Reveal a Preference for Host Glycans », *PLoS ONE*, vol. 6, no 3, p. e17315, mars 2011.
- [56] M. A. McGuckin, S. K. Lindén, P. Sutton, et T. H. Florin, « Mucin dynamics and enteric pathogens », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no 4, p. 265-278, avr. 2011.
- [57] F. Turrone, F. Bottacini, E. Foroni, I. Mulder, J.-H. Kim, A. Zomer, B. Sánchez, A. Bidossi, A. Ferrarini, V. Giubellini, M. Delledonne, B. Henrissat, P. Coutinho, M. Oggioni, G. F. Fitzgerald, D. Mills, A. Margolles, D. Kelly, D. van Sinderen, et M. Ventura, « Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no 45, p. 19514-19519, sept. 2010.
- [58] T. M. Gloster et D. J. Vocadlo, « Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no 8, p. 683-694, août 2012.
- [59] M. Derrien, M. W. J. van Passel, J. H. B. van de Bovenkamp, R. Schipper, et W. de V. and J. Dekker, « Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract », *Gut Microbes*, vol. 1, no 4, p. 254-268, août 2010.
- [60] G. Larson, P. Falk, et L. C. Hoskins, « Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. », *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no 22, p. 10790-10798, mai 1988.
- [61] P. J. Turnbaugh, F. Bäckhed, L. Fulton, et J. I. Gordon, « Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome », *Cell Host Microbe*, vol. 3, no 4, p. 213-223, avr. 2008.
- [62] H. Tilg, A. R. Moschen, et A. Kaser, « Obesity and the Microbiota », *Gastroenterology*, vol. 136, no 5, p. 1476-1483, mai 2009.
- [63] Y. Karrouit, « Innovative drug delivery systems for colon targeting », Berlin, Freie Universität Berlin, Diss., 2008, 2008.
- [64] M. J. Miles, V. J. Morris, P. D. Orford, et S. G. Ring, « The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch », *Carbohydr. Res.*, vol. 135, no 2, p. 271-281, janv. 1985.
- [65] H. N. Englyst et G. T. Macfarlane, « Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria », *J. Sci. Food Agric.*, vol. 37, no 7, p. 699-706, 1986.
- [66] S. G. Ring, J. M. Gee, M. Whittam, P. Orford, et I. T. Johnson, « Resistant starch: Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility *in vitro* », *Food Chem.*, vol. 28, no 2, p. 97-109, 1988.
- [67] V. M. Leloup, P. Colonna, S. G. Ring, K. Roberts, et B. Wells, « Microstructure of amylose gels », *Carbohydr. Polym.*, vol. 18, no 3, p. 189-197, 1992.

- [68] J. . Cummings, S. Milojevic, M. Harding, W. A. Coward, G. R. Gibson, R. Louise Botham, S. G. Ring, E. P. Wraight, M. A. Stockham, M. C. Allwood, et J. M. Newton, « *In vivo* studies of amylose- and ethylcellulose-coated [¹³C]glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon », *J. Controlled Release*, vol. 40, no 1-2, p. 123-131, juin 1996.
- [69] A. W. Basit, « Advances in colonic drug delivery », *Drugs*, vol. 65, no 14, p. 1991-2007, 2005.
- [70] J. Alias, I. Goñi, et M. Gurruchaga, « Enzymatic and anaerobic degradation of amylose based acrylic copolymers, for use as matrices for drug release », *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 92, no 4, p. 658-666, avr. 2007.
- [71] B. Åberg, « Breakdown of Dextran by Human Feces », *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 5, no 1, p. 37-38, janv. 1953.
- [72] S. Chopra, S. Mahdi, J. Kaur, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, et F. J. Ahmad, « Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no 8, p. 1021–1032, 2006.
- [73] E. G. H. M. van den Heuvel, D. Wils, W. J. Pasman, M. Bakker, M.-H. Saniez, et A. F. M. Kardinaal, « Short-term digestive tolerance of different doses of NUTRIOSE®FB, a food dextrin, in adult men », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 58, no 7, p. 1046-1055, 2004.
- [74] W. Pasman, D. Wils, M.-H. Saniez, et A. Kardinaal, « Long-term gastrointestinal tolerance of NUTRIOSE®FB in healthy men », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 60, no 8, p. 1024-1034, févr. 2006.
- [75] C. Lefranc-Millot, L. Guérin-Deremaux, D. Wils, C. Neut, L. E. Miller, et M. H. Saniez-Degrave, « Impact of a Resistant Dextrin on Intestinal Ecology: How Altering the Digestive Ecosystem with NUTRIOSE®, a Soluble Fibre with Prebiotic Properties, May Be Beneficial for Health », *J. Int. Med. Res.*, vol. 40, no 1, p. 211-224, févr. 2012.
- [76] G. V. den Mooter, L. Vervoort, et R. Kinget, « Characterization of Methacrylated Inulin Hydrogels Designed for Colon Targeting: *In Vitro* Release of BSA », *Pharm. Res.*, vol. 20, no 2, p. 303-307, févr. 2003.
- [77] P. Seksik, L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, et J. Doré, « Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon », *Gut*, vol. 52, no 2, p. 237-242, févr. 2003.
- [78] A. Swidsinski, A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, et H. Lochs, « Mucosal flora in inflammatory bowel disease », *Gastroenterology*, vol. 122, no 1, p. 44-54, janv. 2002.
- [79] L. Vervoort et R. Kinget, « *In vitro* degradation by colonic bacteria of inulinHP incorporated in eudragit RS films », *Int. J. Pharm.*, vol. 129, no 1-2, p. 185-190, mars 1996.
- [80] A. Akhgari, F. Farahmand, H. Afrasiabi Garekani, F. Sadeghi, et T. F. Vandamme, « Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 28, no 4, p. 307-314, juill. 2006.

- [81] A. Rubinstein, R. Radai, M. Ezra, S. Pathak, et J. S. Rokem, « *In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier », *Pharm. Res.*, vol. 10, no 2, p. 258-263, févr. 1993.
- [82] A. A. Salyers, S. E. West, J. R. Vercellotti, et T. D. Wilkins, « Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 34, no 5, p. 529-533, nov. 1977.
- [83] S.-S. Yang, K.-T. Cheng, Y.-S. Lin, Y.-W. Liu, et W.-C. Hou, « Pectin hydroxamic acids exhibit antioxidant activities *in vitro* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no 13, p. 4270-4273, juin 2004.
- [84] P. Sriamornsak, « Application of pectin in oral drug delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no 8, p. 1009-1023, mai 2011.
- [85] Z. Wakerly, J. T. Fell, D. Attwood, et D. Parkins, « Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery », *Pharm. Res.*, vol. 13, no 8, p. 1210-1212, août 1996.
- [86] I. S. Ahmed, « Effect of simulated gastrointestinal conditions on drug release from pectin/ethylcellulose as film coating for drug delivery to the colon », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 31, no 4-5, p. 465-470, mai 2005.
- [87] O. Munjeri, P. Hodza, E. E. Osim, et C. T. Musabayane, « An investigation into the suitability of amidated pectin hydrogel beads as a delivery matrix for chloroquine », *J. Pharm. Sci.*, vol. 87, no 8, p. 905-908, août 1998.
- [88] G. S. Macleod, J. T. Fell, J. H. Collett, H. L. Sharma, et A. M. Smith, « Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropyl methylcellulose film coated tablets », *Int. J. Pharm.*, vol. 187, no 2, p. 251-257, oct. 1999.
- [89] M. Orlu, E. Cevher, et A. Araman, « Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges », *Int. J. Pharm.*, vol. 318, no 1-2, p. 103-117, août 2006.
- [90] W. Zhang, K. M. Mahuta, B. A. Mikulski, J. N. Harvestine, J. Z. Crouse, J. C. Lee, M. G. Kaltchev, et C. S. Tritt, « Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery », *Pharm. Dev. Technol.*, p. 1-4, sept. 2014.
- [91] R. Hejazi et M. Amiji, « Chitosan-based gastrointestinal delivery systems », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 89, no 2, p. 151-165, avr. 2003.
- [92] L. Illum, « Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 9, p. 1326-1331, sept. 1998.
- [93] H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, et S. Muranishi, « Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon », *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no 9, p. 1016-1021, sept. 1997.
- [94] M. K. Chourasia et S. K. Jain, « Design and development of multiparticulate system for targeted drug delivery to colon », *Drug Deliv.*, vol. 11, no 3, p. 201-207, juin 2004.
- [95] H. Tozaki, Y. Emi, E. Horisaka, T. Fujita, A. Yamamoto, et S. Muranishi, « Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat

caecal contents: implications in peptide delivery to the colon », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 49, no 2, p. 164-168, févr. 1997.

[96] V. Ravi, Siddaramaiah, et T. M. Pramod Kumar, « Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no 5, p. 2131-2136, mai 2008.

[97] M. Drechsler, G. Garbacz, R. Thomann, et R. Schubert, « Development and evaluation of chitosan and chitosan/Kollicoat® Smartseal 30 D film-coated tablets for colon targeting », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*

[98] S. A. Altaf, K. Yu, J. Parasrampur, et D. R. Friend, « Guar gum-based sustained release diltiazem », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 8, p. 1196-1201, août 1998.

[99] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, et P. K. Sharma, « Novel prospective in colon specific drug delivery system », *Polim. Med.*, vol. 44, no 2, p. 109-118, juin 2014.

[100] I. Gliko-Kabir, B. Yagen, A. Penhasi, et A. Rubinstein, « Low swelling, crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 7, p. 1019-1025, juill. 1998.

[101] Y. S. Krishnaiah, S. Satyanarayana, Y. V. Rama Prasad, et S. Narasimha Rao, « Gamma scintigraphic studies on guar gum matrix tablets for colonic drug delivery in healthy human volunteers », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 55, no 2-3, p. 245-252, nov. 1998.

[102] J. Madan, S. R. Gundala, B. Baruah, M. Nagaraju, C. Yates, T. Turner, V. Rangari, D. Hamelberg, M. D. Reid, et R. Aneja, « Cyclodextrin Complexes of Reduced Bromonoscaphine in Guar Gum Microspheres Enhance Colonic Drug Delivery », *Mol. Pharm.*, nov. 2014.

[103] S. Y. Lin et J. W. Ayres, « Calcium alginate beads as core carriers of 5-aminosalicylic acid », *Pharm. Res.*, vol. 9, no 9, p. 1128-1131, sept. 1992.

[104] V. R. Sinha et R. Kumria, « Polysaccharides in colon-specific drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 224, no 1-2, p. 19-38, août 2001.

[105] T. S. Nielsen, H. N. Lærke, P. K. Theil, J. F. Sørensen, M. Saarinen, S. Forssten, et K. E. Bach Knudsen, « Diets high in resistant starch and arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs », *Br. J. Nutr.*, vol. 112, no 11, p. 1837-1849, déc. 2014.

[106] A. Sintov, N. Di-Capua, et A. Rubinstein, « Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes », *Biomaterials*, vol. 16, no 6, p. 473-478, 1995.

[107] P. Nykänen, S. Lempää, M. L. Aaltonen, H. Jürjenson, P. Veski, et M. Marvola, « Citric acid as excipient in multiple-unit enteric-coated tablets for targeting drugs on the colon », *Int. J. Pharm.*, vol. 229, no 1-2, p. 155-162, oct. 2001.

[108] C. A. Kumar Varma, S. G. Panpalia, et K. J. Kumar, « Physicochemical and release characteristics of acetylated Indian palmyrah retrograded shoot starch », *Int. J. Biol. Macromol.*, mai 2014.

- [109] B.-B. Huang, G.-F. Li, J.-H. Luo, L. Duan, K. Nobuaki, et Y. Akira, « Permeabilities of rebamipide via rat intestinal membranes and its colon specific delivery using chitosan capsule as a carrier », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 14, no 31, p. 4928-4937, août 2008.
- [110] M. Z. Khan, H. P. Stedul, et N. Kurjaković, « A pH-dependent colon-targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. II. Manipulation of drug release using Eudragit L100 and Eudragit S100 combinations », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 26, no 5, p. 549-554, mai 2000.
- [111] J. Alvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, M. L. González-Rodríguez, M. Cirri, et P. Mura, « Development of enteric-coated timed-release matrix tablets for colon targeting », *J. Drug Target.*, vol. 12, no 9-10, p. 607-612, 2004.
- [112] M. Z. Khan, Z. Prebeg, et N. Kurjaković, « A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation Of drug release using Eudragit L100-55 and Eudragit S100 combinations », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 58, no 2, p. 215-222, mars 1999.
- [113] M. E. Sangalli, A. Maroni, L. Zema, C. Buseti, F. Giordano, et A. Gazzaniga, « *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral system for time and/or site-specific drug delivery », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 73, no 1, p. 103-110, mai 2001.
- [114] O. Munjeri, J. H. Collett, J. T. Fell, H. L. Sharma, et A. M. Smith, « *In vivo* behavior of hydrogel beads based on amidated pectins », *Drug Deliv.*, vol. 5, no 4, p. 239-241, 1998.
- [115] E. Fukui, N. Miyamura, K. Uemura, et M. Kobayashi, « Preparation of enteric coated timed-release press-coated tablets and evaluation of their function by *in vitro* and *in vivo* tests for colon targeting », *Int. J. Pharm.*, vol. 204, no 1-2, p. 7-15, août 2000.
- [116] H. Wei, D. Qing, C. De-Ying, X. Bai, et F. Li-Fang, « In-vitro and in-vivo studies of pectin/ethylcellulosefilm-coated pellets of 5-fluorouracil for colonic targeting », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 60, no 1, p. 35-44, janv. 2008.
- [117] S. J. Kshirsagar, M. R. Bhalekar, et R. R. Umap, « Design, development and *in vitro*-*in vivo* study of a colon-specific fast disintegrating tablet », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 16, no 5, p. 449-456, oct. 2011.
- [118] Y. S. Krishnaiah, P. Veer Raju, B. Dinesh Kumar, P. Bhaskar, et V. Satyanarayana, « Development of colon targeted drug delivery systems for mebendazole », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 77, no 1-2, p. 87-95, nov. 2001.
- [119] Y. S. R. Krishnaiah, V. Satyanarayana, B. Dinesh Kumar, et R. S. Karthikeyan, « *In vitro* drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil », *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 16, no 3, p. 185-192, août 2002.
- [120] I. El-Gibaly, « Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 232, no 1-2, p. 199-211, janv. 2002.
- [121] Y. Karrou, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Colon targeting with bacteria-sensitive films adapted to the disease state », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 73, no 1, p. 74-81, sept. 2009.

- [122] M. Rodríguez, J. L. Vila-Jato, et D. Torres, « Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 55, no 1, p. 67-77, oct. 1998.
- [123] Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, « Monography 2.9.3.- Essai de dissolution des formes solides. », in *Pharmacopée Européenne 7.3*, 2013.
- [124] H. Wei, F. Li-Fang, B. Min, C. Yong-Zhen, X. Bai, D. Qing, W. Feng, Q. Min, et C. De-Ying, « Chitosan/Kollocoat SR 30D film-coated pellets of aminosalicylates for colonic drug delivery », *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no 1, p. 186-195, janv. 2010.
- [125] H. Zhang, I. A. Alsarra, et S. H. Neau, « An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon », *Int. J. Pharm.*, vol. 239, no 1-2, p. 197-205, juin 2002.
- [126] H. Liu, X.-G. Yang, S.-F. Nie, L.-L. Wei, L.-L. Zhou, H. Liu, R. Tang, et W.-S. Pan, « Chitosan-based controlled porosity osmotic pump for colon-specific delivery system: Screening of formulation variables and *in vitro* investigation », *Int. J. Pharm.*, vol. 332, no 1-2, p. 115-124, mars 2007.
- [127] J. R. Amrutkar et S. G. Gattani, « Chitosan-chondroitin sulfate based matrix tablets for colon specific delivery of indomethacin », *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no 2, p. 670-677, 2009.
- [128] O. A. Odeku et J. T. Fell, « In-vitro evaluation of khaya and albizia gums as compression coatings for drug targeting to the colon », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 57, no 2, p. 163-168, févr. 2005.
- [129] A. Vaidya, A. Jain, P. Khare, R. K. Agrawal, et S. K. Jain, « Metronidazole loaded pectin microspheres for colon targeting », *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no 11, p. 4229-4236, nov. 2009.
- [130] Y. V. R. Prasad, Y. S. R. Krishnaiah, et S. Satyanarayana, « *In vitro* evaluation of guar gum as a carrier for colon-specific drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 51, no 2-3, p. 281-287, févr. 1998.
- [131] Y. Dong, Z. Zhou, H. Ding, et S. Zhang, « Preparation and properties of a pH sensitive carrier based on three kinds of polymer blend to control the release of 5-amino salicylic acid », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 19, no 8, p. 960-967, déc. 2014.
- [132] M. Xu, M. Sun, H. Qiao, Q. Ping, et E. S. Elamin, « Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 165-171, juill. 2014.
- [133] N. K. Thakral, A. R. Ray, D. Bar-Shalom, A. H. Eriksson, et D. K. Majumdar, « The quest for targeted delivery in colon cancer: mucoadhesive valdecoxib microspheres », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, p. 1057-1068, 2011.
- [134] H. Onishi, T. Oosegi, Y. Machida, et J. W. McGinity, « Eudragit coating of chitosan-prednisolone conjugate microspheres and *in vitro* evaluation of coated microspheres », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no 8, p. 848-854, août 2007.

- [135] K. L. Shantha, P. Ravichandran, et K. P. Rao, « Azo polymeric hydrogels for colon targeted drug delivery », *Biomaterials*, vol. 16, no 17, p. 1313-1318, 1995.
- [136] A. K. Singh et K. Pathak, « Colon specific CODES based Piroxicam tablet for colon targeting: statistical optimization, *in vivo* roentgenography and stability assessment », *Pharm. Dev. Technol.*, p. 1-9, nov. 2013.
- [137] P. J. Wilson et A. W. Basit, « Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: An *in vitro* study using amylose coated tablets », *Int. J. Pharm.*, vol. 300, no 1-2, p. 89-94, août 2005.
- [138] A. Elyagoby, N. Layas, et T. W. Wong, « Colon-specific delivery of 5-fluorouracil from zinc pectinate pellets through In Situ intracapsular ethylcellulose–pectin plug formation », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no 2, p. 604–616, 2013.
- [139] F. Maestrelli, M. Cirri, G. Corti, N. Mennini, et P. Mura, « Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 69, no 2, p. 508-518, juin 2008.
- [140] A. Akhgari, M. Abbaspour, et M. Moradkhanizadeh, « Combination of Pectin and Eudargit RS and Eudragit RL in the Matrix of Pellets Prepared by Extrusion-Spheronization for Possible Colonic Delivery of 5-Amino Salicylic Acid », *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 8, no 2, p. 86-92, 2013.
- [141] Y. S. R. Krishnaiah, P. R. Bhaskar Reddy, V. Satyanarayana, et R. S. Karthikeyan, « Studies on the development of oral colon targeted drug delivery systems for metronidazole in the treatment of amoebiasis », *Int. J. Pharm.*, vol. 236, no 1-2, p. 43-55, avr. 2002.
- [142] J. Varshosaz, J. Emami, N. Tavakoli, M. Minaiyan, N. Rahmani, F. Dorkoosh, et P. Mahzouni, « Development of novel budesonide pellets based on CODES(TM) technology: *In vitro/in vivo* evaluation in induced colitis in rats », *Daru J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.*, vol. 19, no 2, p. 107-117, 2011.
- [143] A. Rubinstein, D. Nakar, et A. Sintov, « Colonic Drug Delivery: Enhanced Release of Indomethacin from Cross-Linked Chondroitin Matrix in Rat Cecal Content », *Pharm. Res.*, vol. 9, no 2, p. 276-278, févr. 1992.
- [144] M. Z. Ahmad, S. Akhter, M. Anwar, A. Singh, I. Ahmad, M. R. Ain, G. K. Jain, R. K. Khar, et F. J. Ahmad, « Feasibility of Assam Bora rice starch as a compression coat of 5-fluorouracil core tablet for colorectal cancer », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 9, no 1, p. 105-110, janv. 2012.
- [145] S. S. Dhaneshwar, M. Chail, M. Patil, S. Naqvi, et G. Vadnerkar, « Colon-specific mutual amide prodrugs of 4-aminosalicylic acid for their mitigating effect on experimental colitis in rats », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no 1, p. 131-142, janv. 2009.
- [146] A. W. Basit, M. D. Short, et E. L. McConnell, « Microbiota-triggered colonic delivery: Robustness of the polysaccharide approach in the fed state in man », *J. Drug Target.*, vol. 17, no 1, p. 64-71, janv. 2009.

- [147] R. Sharma, R. K. Rawal, T. Gaba, N. Singla, M. Malhotra, S. Matharoo, et T. R. Bhardwaj, « Design, synthesis and ex vivo evaluation of colon-specific azo based prodrugs of anticancer agents », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no 19, p. 5332-5338, oct. 2013.
- [148] V. Araujo, A. Gamboa, N. Caro, L. Abugoch, M. Gotteland, F. Valenzuela, H. A. Merchant, A. W. Basit, et C. Tapia, « Release of prednisolone and inulin from a new calcium-alginate chitosan-coated matrix system for colonic delivery », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no 8, p. 2748-2759, août 2013.
- [149] C. Tannergren, A. Borde, C. Boreström, B. Abrahamsson, et A. Lindahl, « Evaluation of an *in vitro* faecal degradation method for early assessment of the impact of colonic degradation on colonic absorption in humans », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 57, p. 200-206, juin 2014.
- [150] S. D. Siciliano, B. D. Laird, et C. L. Lemieux, « Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands », *Chemosphere*, vol. 80, no 9, p. 1101-1108, août 2010.
- [151] P. Allsopp, S. Possemiers, D. Campbell, I. S. Oyarzábal, C. Gill, et I. Rowland, « An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity », *Anaerobe*, vol. 22, p. 38-44, août 2013.
- [152] S. Worametrachanon, A. Apichartsrangkoon, P. Chaikham, P. Van den Abbeele, T. Van de Wiele, et T. I. Wirjantoro, « Effect of encapsulated *Lactobacillus casei* 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no 11, p. 5241-5250, juin 2014.
- [153] M. Ouethrani, T. Van de Wiele, E. Verbeke, A. Bruneau, M. Carvalho, S. Rabot, et V. Camel, « Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon », *Food Chem.*, vol. 141, no 4, p. 3291-3300, déc. 2013.
- [154] W. M. Brück, G. Graverholt, et G. R. Gibson, « Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria », *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 41, no 3, p. 231-237, sept. 2002.
- [155] E. Barroso, T. Van de Wiele, A. Jiménez-Girón, I. Muñoz-González, P. J. Martín-Alvarez, M. V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé, C. Peláez, M. C. Martínez-Cuesta, et T. Requena, « *Lactobacillus plantarum* IFPL935 impacts colonic metabolism in a simulator of the human gut microbiota during feeding with red wine polyphenols », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, avr. 2014.
- [156] A. Jain, Y. Gupta, et S. K. Jain, « Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon », *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.*, vol. 10, no 1, p. 86-128, 2007.
- [157] K. Mladenovska, O. Cruaud, P. Richomme, E. Belamie, R. S. Raicki, M.-C. Venier-Julienne, E. Popovski, J. P. Benoit, et K. Goracinova, « 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization », *Int. J. Pharm.*, vol. 345, no 1-2, p. 59-69, déc. 2007.
- [158] K. Mladenovska, R. S. Raicki, E. I. Janevik, T. Ristoski, M. J. Pavlova, Z. Kavrakovski, M. G. Dodov, et K. Goracinova, « Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic

acid from chitosan-Ca-alginate microparticles », *Int. J. Pharm.*, vol. 342, no 1-2, p. 124-136, sept. 2007.

[159] Y. Karrou, L. Dubuquoy, C. Piveteau, F. Siepmann, E. Moussa, D. Wils, T. Beghyn, C. Neut, M.-P. Flament, L. Guerin-Deremaux, L. Dubreuil, B. Deprez, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « *In vivo* efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy », *J. Controlled Release*, vol. 197, p. 121-130, janv. 2015.

[160] S. M. Al-Saidan, Y. S. R. Krishnaiah, V. Satyanarayana, et G. S. Rao, « *In vitro* and *in vivo* evaluation of guar gum-based matrix tablets of rofecoxib for colonic drug delivery », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 2, no 2, p. 155-163, avr. 2005.

[161] R. M. J. Palmer, M. Newton, A. Basit, et J. Bloor, « Colonic release composition ».

[162] S. B. Hanauer et M. Sparrow, « COLAL-PRED Alizyme », *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000, vol. 5, no 11, p. 1192-1197, nov. 2004.

[163] C. J. Kenyon, R. V. Nardi, D. Wong, G. Hooper, I. R. Wilding, et D. R. Friend, « Colonic delivery of dexamethasone: a pharmacoscintigraphic evaluation », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 11, no 1, p. 205-213, févr. 1997.

[164] L. A. Hodges, K. A. Sime, L. A. Creech, S. M. Connolly, S. T. Barclay, M. C. Kwon, B. J. Jeon, S. M. Shim, H. S. Wang, H. N. E. Stevens, et J. S. Park, « Pharmacoscintigraphy confirms consistent tamsulosin release from a novel triple-layered tablet », *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no 1, p. 41-46, sept. 2013.

Conclusion intermédiaire

Les stratégies utilisées pour cibler la libération de principes actifs dans le côlon sont diverses, mais celle utilisant des formulations sensibles aux enzymes bactériennes semble être la plus spécifique. Les méthodes utilisées pour tester la libération du médicament à partir de ces formes sont nombreuses. L'utilisation de bactéries coliques ou d'enzymes bactériennes coliques semble être essentielle pour simuler ce compartiment et montrer une spécificité de la libération du PA à partir de la formulation. Il est essentiel d'intégrer un aspect bactériologique (de comptage et d'identification bactérienne) dans les recherches galéniques concernant la libération colique de PA. En effet, la plus grande particularité du côlon est son microbiote spécifique et varié. Les Pharmacopées ne décrivent pas encore de méthode standard. Cependant les pratiques d'homogénéisation permettraient de comparer les résultats des tests de libération de PA de différentes formulations à ciblage colique et participeraient au développement de nouveaux médicaments.

Chapitre 2

**La stratégie de ciblage colique
utilisant des formulations
sensibles aux enzymes
bactériennes, est-elle encore
efficace chez les patients traités
par antibiothérapie?**

Présentation

Les systèmes à libération colique ont été reconnus comme présentant d'importants avantages thérapeutiques. Ils améliorent considérablement le traitement de nombreuses pathologies à atteintes coliques telles que les MICI, le cancer du côlon, le syndrome du côlon irritable et la constipation. La libération colique serait également utile dans les chronothérapies, quand, du point de vue thérapeutique, un retard à l'absorption est nécessaire, notamment dans le traitement de pathologies comme l'asthme nocturne ou l'angor, ou les traitements d'addiction à la nicotine. Aussi, l'absorption des médicaments protéiques ou peptidiques est meilleure au niveau colique. Ce phénomène est dû notamment, à une activité protéolytique nettement plus faible au niveau du côlon qu'au niveau de l'intestin grêle et à l'absence d'une activité peptidasique associée à la membrane des cellules épithéliales coliques. Il y a donc un intérêt pour l'utilisation du côlon comme site d'absorption de ces principes actifs peptidiques comme les analgésiques, les contraceptifs, les vaccins ou l'insuline dont l'administration se fait jusqu'à maintenant, essentiellement par voie parentérale, douloureuse et à l'origine d'une mauvaise acceptabilité.

Le traitement des MICI est avant tout symptomatique et médicamenteux. La libération colique des principes actifs anti-inflammatoires ou antibiotiques utilisés pour ces traitements améliorerait leur efficacité et diminuerait leurs effets indésirables systémiques. C'est pourquoi la recherche sur le ciblage colique est en plein essor dans ces indications.

Dans cette étude, nous avons effectué un screening de polysaccharides pouvant avoir un intérêt dans le développement de nouvelles formes à ciblage colique. Une première sélection a été faite en étudiant la libération du PA dans des milieux simulant le HTGI. Les formulations prometteuses avec une faible libération prématurée ont ensuite été testées dans un milieu colique simulé, composé de milieu de culture inoculé avec des selles de patients atteints de MICI. Une sélection de ces formulations basée sur leur taux de libération colique a été réalisée. Les deux meilleures formulations sélectionnées ont été testées avec plusieurs échantillons de matières fécales de patients traités ou non par antibiothérapie afin de montrer la reproductibilité du test de libération mise en œuvre dans des conditions simulant une inflammation du côlon. Des tests statistiques ont été effectués afin de comparer la libération

de PA des deux formulations, mais aussi les taux de libération obtenus avec les selles de patients traités ou non avec des antibiotiques. Durant ce test de dissolution, la croissance bactérienne a été étudiée afin de vérifier l'effet de la composition des polysaccharides d'enrobage sur le microbiote colique. En outre, certaines bactéries présentes dans les échantillons de selles de patients ont été isolées et testées individuellement ou en mélanges bactériens afin d'étudier la possibilité d'utiliser un mélange de bactéries comme substitut du échantillon de selles fraîches pour tester les nouvelles formulations à libération colique ciblée.

I. Introduction

La compliance des patients sous traitement au long court est importante, spécialement pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [1], [2]. Les voies d'administration des traitements disponibles pour ces pathologies sont la voie rectale, orale ou injectable [3]. Dans un environnement où les thérapies individualisées et ciblées se développent, des formulations délivrant la substance active (SA) au plus proche de son site d'action sont élaborées. Ainsi, la libération ciblée au niveau du colon présente un intérêt majeur dans le traitement des maladies intestinales telles que les MICI [4], le cancer colorectal [5], ou encore la constipation. Cette stratégie est utilisée pour administrer par voie orale des formulations dans le but d'obtenir un effet colique, notamment lorsque des localisations de lésions ne sont pas par la voie rectale. Enfin, la dose de SA de la formulation est adaptée et permet d'augmenter l'efficacité et de diminuer le risque d'effets indésirables (EI) associé à la libération prématurée de la SA.

La libération colique est obtenue par des techniques de formulation médicamenteuse qui minimisent la libération de la SA durant le transit dans le haut tractus gastro-intestinal (HTGI: estomac et intestine grêle) et qui est suivie d'une libération dans le côlon. De nombreuses stratégies existent pour conduire la formulation intacte jusqu'au côlon, utilisant les paramètres physico-chimiques spécifiques des différents compartiments du TGI [6]. Cependant, l'approche consistant en l'application d'un enrobage sensible aux enzymes bactériennes semble être la plus spécifique. Ces enrobages sont souvent composés de polysaccharides naturels ou modifiés [7] (non digestibles par les enzymes digestives humaines) fermentés par les bactéries coliques.

Le développement de nouvelles thérapies pour la libération ciblée au niveau du côlon est lent et il n'y a seulement que quelques produits commercialisés. Pour tester leur libération, il est nécessaire de simuler chaque compartiment gastro-intestinal, ainsi des méthodes différentes, plus ou moins proches des conditions physiologiques [8], sont déjà utilisées, cependant aucun standard n'est encore validé. Y. Karrouf et al. ont étudié trois produits commercialisés (Pentasa®, Asacol® et Lialda®), et ont montré une libération significative de la SA dans le HTGI (plus de 50% dans l'estomac pour le Pentasa® et plus de 50% dans l'intestin grêle pour l'Asacol®). Le Lialda®, contrairement aux autres, libère peu de SA dans

le HTGI (moins de 10%), mais la formulation ne libère pas non plus de SA lorsqu'elle est mise en contact avec un milieu de culture inoculé avec des selles de patients [9].

Dans cette étude, nous avons mené un criblage de polysaccharides qui pouvaient avoir un intérêt dans le développement de nouvelles formulations à libération colique. Une première sélection a été faite en suivant la libération de SA dans un milieu simulant le HTGI. Les formulations prometteuses avec un faible niveau de SA libéré dans le HTGI ont alors été testées dans un milieu simulant le côlon consistant en un milieu de culture inoculé de selles de patients atteints de MICI traités ou non par des antibiotiques et une sélection selon le taux de libération colique a été effectuée. Les deux meilleures formulations sélectionnées ont été testées avec de multiples échantillons fécaux de patients dans le but de montrer la reproductibilité du test de libération mis en oeuvre simulant les conditions d'un côlon inflammé. Des tests statistiques ont été réalisés pour comparer la libération de deux formulations mais aussi les taux de libération de SA obtenus avec des selles de patients traités ou non par des antibiotiques (ATB). Durant les tests de dissolution sous conditions coliques, la croissance bactérienne a été étudiée pour vérifier l'effet des compositions des enrobages de polysaccharides sur le microbiote colique. Aussi, quelques bactéries ont été isolées des selles de patients et testées individuellement ou en mélange pour étudier la possibilité d'utiliser un mélange bactérien comme substitut des selles fraîches de patients pour tester la libération colique de nouvelles formulations à libération colique.

II. Matériels et méthodes

1) Matériels

Acide 5-Aminosalicilic (5-ASA; Sigma–Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, France); Inuline (BENEO GmbH, Mannheim – Germany); Actistar (C-Actistar 11700, maltodextrine de tapioca, Cargill, Haubourdin, France); PenFibeRS (amidon résistant, modifié de pomme de terre, Penford Food Ingredients Co, Centennial, United States); CPharmGel (CPharmGel 03302, amidon de maïs pré-gélatinisé, Cargill, Haubourdin, France); cellulose microcristalline (Avicel PH 101; FMC Biopolymer, Bruxelles, Belgique); bentonite et polyvinylpyrrolidone (PVP, Povidone K 30) (Coopération Pharmaceutique Française, Melun, France); dispersion aqueuse d'éthylcellulose (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymers, Bruxelles, Belgium); triéthyle citrate (TEC, Morflex, Greensboro, USA); gélose de sang Columbia, extrait de boeuf et de levures ainsi que de la tryptone (=produits de réaction de digestion pancréatique de caséine) (Becton Dickinson, Sparks, USA); hydrate de cystéine hydrochloride (Acros

Organics, Geel, Belgique); gélose McConkey (BioMérieux, Balme-les-Grottes, France) Solution de Ringer cysteinatée (Merck, Darmstadt, Allemagne); Système de galerie API 20E (BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France).

2) Préparation des minigranules chargées de substance active

Des noyaux de minigranules chargés de SA (diamètre: 710–1000 µm; 60% 5-ASA, 32% cellulose microcristalline, 4% bentonite, 4% PVP: Polyvinyl Pyrrolidone) ont été préparés par extrusion sphéronisation. La poudre était mélangée dans un granulater à grande vitesse (Lödige, Paderborn, Germany) et de l'eau purifiée était ajoutée jusqu'à l'obtention d'une masse homogène (41 g d'eau pour 100 g de mélange de poudre). Le mélange humide était passé à travers un cylindre d'extrusion (SK M / R; Alexanderwerk, Remscheid, Germany). Les extrudats étaient ensuite sphéronisés à 520 rpm (Spheronizer model 15; Calveva, Dorset, United Kingdom) et séchés dans un lit d'air fluidisé à 40°C durant 30 min (ST 15; Aéromatic, Muttenz, Switzerland). La fraction de taille "710–1000 µm" a été obtenue par tamisage [10].

3) Préparation des minigranules enrobées

Les polysaccharides ont été dissouts dans de l'eau purifiée (5%, w/w). La dispersion aqueuse d'éthylcellulose était plastifiée toute une nuit avec 25 % de triéthyle citrate (w/w, sur la base de la masse de polymère) sous agitation magnétique et diluée avec la solution de polysaccharides jusque 15% (w/w) de teneur en polymère 30 min avant l'enrobage. Les polysaccharides et l'éthylcellulose étaient mélangés aux ratios 1:2, 1:3, 1:4 or 1:5 (w/w, basé sur la masse sèche de polymère non plastifiée). Les minigranules chargées en SA étaient enrobées dans un lit d'air fluidisé équipé d'un Wurster (Strea 1; Niro, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland) jusqu'à atteindre un gain de poids de 15 et 20% (w/w). Les paramètres du procédé sont les suivants : la température de l'air entrant : 39 ± 2 °C, la température de l'enrobage: 39 ± 2 °C, la vitesse de pulvérisation: 1.5 to 3 g / min, la pression de pulvérisation: 1.2 bar, le diamètre de la buse de pulvérisation: 1.2 mm. Après l'enrobage, les minigranules étaient séchées dans un lit d'air fluidisé durant 10 min additionnelles et ensuite durcies dans un four durant 24h à 60 °C.

Le tableau 1 montre les différentes formulations développées à partir des minigranules chargées en 5-ASA et enrobées avec un mélange de polysaccharide et d'éthylcellulose avec différents ratios et des niveaux d'enrobage variés.

Nom de Formulation	Polysaccharides	Ratio Polysaccharide : Ethylcellulose	Niveau d'enrobage
F1	Inuline	1 : 4	20%
F2	Inuline	1 : 5	20%
F3	Actistar®	1 : 4	20%
F4	Actistar®	1 : 3	15%
F5	Actistar®	1 : 3	20%
F6	Actistar®	1 : 2	15%
F7	Actistar®	1 : 2	20%
F8	PenFiber®	1 : 4	15%
F9	PenFiber®	1 : 3	15%
F10	PenFiber®	1 : 3	20%
F11	PenFiber®	1 : 2	15%
F12	PenFiber®	1 : 2	20%
F13	CPharmGe®I	1 : 4	20%
F14	-	0 : 1	15%
F15	-	0 : 1	20%

Tableau 1: Composition des formulations.

4) Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture était préparé par dissolution de 1.5 g d'extrait de bœuf, 3 g d'extrait de levures, 5 g de tryptone, 2.5 g de NaCl et 0.3 g d'hydrochloride de L-cystéine sans 1 L d'eau distillée (pH 7.0±0.2) et ensuite stérilisé (20 min, 115°C).

5) Préparation des échantillons fécaux

Les selles étaient diluées au 1:200 avec une solution de Ringer cystéiné; 2.5mL de cette suspension étaient diluées avec le milieu de culture pour obtenir un volume final de 100mL.

Le taux moyen de bactéries au début du test de libération est 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) / 100ml de milieu de culture pour les selles de patients non traités par ATB et environ 10^6 UFC / 100ml pour les selles de patients traités par ATB.

6) Patients

Les selles de patients atteints de maladie de Crohn (MC) ou de rectocolite hémorragique (RC) provenaient des patients des services de consultation et d'hospitalisation du service de Gastro-enterologie de l'hôpital Claude Huriez du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille (France). Les selles de patients traités ou non par ATB étaient collectées. La combinaison d'ATB utilisée était toujours la même : ciprofloxacine et métronidazole. Les résultats étaient divisés en deux groupes : selles de patients avec ATB (appelé « avec ATB » ou “ATB”) et les selles de patients sans ATB (appelé “sans ATB” ou “ATB Free”).

Les caractéristiques de patients ont été recueillies dans les dossiers du patient, tels que:

- Leur sexe,
- Leur pathologie (maladie de Crohn “MC” or Rectocolite hémorragique “RCH”),
- Leur âge au prélèvement,
- Leur âge au diagnostique,
- L'information sur leur hospitalisation ou s'ils venaient du service de consultation le jour du prélèvement,
- L'information si les patients étaient fumeurs ou non le jour du prélèvement,
- L'information si les patients avaient des antécédents de dépendance au tabac,
- L'information si les patients avaient subi une chirurgie de résection ou pas,
- L'information sur l'évolution de la maladie de Crohn:
 - Les patients étaient classés selon le score de Harvey Bradshaw [11]:
 - Patients en rémission: Harvey Bradshaw score < 5
 - Patients avec une pathologie « modérément active »: Harvey Bradshaw score = 5-7
 - Patients avec une pathologie « active sévère » : Harvey Bradshaw score = 8-16

- Les patients étaient classés selon le score de Montréal [12], [13]:
 - Pour la localisation des lésions :
 - Lésions iléales: Score de Montréal = L1
 - Lésions coliques : Score de Montréal = L2
 - Lésions iléo coliques: Score de Montréal = L3
 - Pour l'évolution des lésions:
 - Lésions non sténosantes et non pénétrantes: score de Montréal = B1
 - Lésions sténosantes: score de Montréal = B2
 - Lésions pénétrantes: score de Montréal = B3
- Information sur l'évolution de la RCH:

Les patients étaient classés selon les scores endoscopiques : le Mayo score [14] et le score UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) [15], [16] , en deux grades:

- Les patients en rémission
- Les patients avec une pathologie active

7) Les études de libération de la substance active

a) Test de libération dans le haut tractus gastro-intestinal (HTGI)

La libération de SA à partir de minigranules est mesurée dans le HCl 0,1 M pendant 2 h, puis dans le tampon phosphate pH 7,4 (USP 38) pendant 6 h en utilisant l'appareil USP Apparatus 3 (Bio-Dis; Varian, Paris, France) (le volume total de dissolution est de 200 mL; à 37 °C, 10 rpm et 5 rpm; n=3). A des temps prédéterminés, des échantillons de 3 mL étaient prélevés et le dosage de 5-ASA était réalisé en spectrophotométrie UV visible à $\lambda=303$ nm pour les échantillons prélevés dans l'HCl et $\lambda=330$ nm pour les échantillons prélevés dans le tampon Phosphate (Anthelie Advanced, Secomam, Domont, France).

b) Test de libération dans les conditions coliques

La libération de la SA à partir de minigranules était mesurée , après un prétraitement de 10h dans le milieu simulant le HTGI (dans la solution d'HCl 0,1 M HCl pH 1,2 durant 2h

suivie par le tampon Phosphate pH 7,4 durant 8h) en utilisant l'appareil USP Apparatus 3 (Bio-Dis; Varian, Paris, France) (le volume total de dissolution était de 200 mL; à 37 °C, 10 rpm et 5 rpm), dans des bouteilles de verre de 120 mL (diamètre: 4.5 cm, hauteur: 10 cm) remplies avec 100 mL de milieu de culture inoculé avec des selles de patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin (à 50 rpm, 37 °C, sous des conditions d'anaérobiose (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂ dans une chambre anaérobie Don Whitley Scientific, United Kingdom), n=3. A des temps prédéterminés, des échantillons de 3 mL étaient prélevés, centrifugés à 15,000 rpm pendant 10 min, filtrés (0.22 µm) pour la stérilisation et le dosage du 5-ASA était réalisé par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP; ProStar 230; Varian) avec une détection UV/Visible et une colonne C18 (Varian, Pursuit 5 µm, C18, 250 x 4.6 mm). Le Système CLHP était équipé du programme de chromatographie Galaxie® (Varian).

La phase mobile utilisée était un mélange de 10% de méthanol et de 90% de solution aqueuse d'acide acétique (1%, w/v) filtré. Les paramètres du procédé sont les suivants : vitesse du flux de la phase mobile : 0.5 ml/min; détection UV $\lambda=300$, le volume d'injection = 50 µL, le temps de rétention du 5-ASA = 7.5 min.

8) Analyse bactériologique

Les dénombrements bactériens étaient réalisés sur les échantillons fécaux au début et à la fin de chaque test de libération dans les conditions coliques simulées. Une identification bactérienne des bactéries prédominantes initialement présentes dans l'échantillon de selles était mise en œuvre. Les dénombrements étaient faits par la préparation de huit dilutions décimales de l'échantillon de selles dans une solution RC 0,1 ml de chaque dilution était étalé sur une plaque de gélose non sélective: gélose au sang (Columbia blood) [17] (pour le dénombrement de la flore totale cultivable) et sur gélose McConkey (sélective pour les entérobactéries). Les plaques de gélose au sang étaient incubées durant une semaine à 37°C dans des conditions d'anaérobiose (5 % CO₂, 10 % H₂, 85 % N₂). Les colonies prédominantes, présentes sur la gélose au sang étaient repiquées et identifiées sur la base des critères d'identification phénotypiques [17]. Les plaques de géloses McConkey étaient incubées durant 24h à 37°C dans des conditions d'aérobiose. Les colonies les plus nombreuses étaient identifiées en utilisant des système de galeries API 20E®. Les dénombrements étaient exprimés en log UFC (Unité Formant Colonie) / 100 ml de milieu ou gramme de selles.

9) Analyse statistique

Des boxplots ont été développées pour étudier la dispersion des données. Le test ANOVA a été réalisé pour comparer les différentes formulations pharmaceutiques, après vérification de la normalité de la distribution des données par le test de Shapiro-Wilk. Ces tests étaient réalisés pour étudier la différence de taux de libération T10H et T68h (appelé "la libération colique T10-T68"). Le test post hoc de Tukey était réalisé pour comparer une à une chaque formulation et pour montrer la supériorité d'une formulation par rapport aux autres. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la distribution des valeurs de libération entre deux populations correspondant aux selles de patients traités avec ATB ou non. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel informatique SPSS version 20.0 (IBM SPSS Statistics, IBM Corp., Somers, NY, United States).

III. Résultats et discussion

1) Libération dans le haut tractus gastro-intestinale (HTGI)

La libération de 5-ASA à partir des minigranules enrobées dans le milieu simulant les conditions du HTGI est assez limitée durant les 8 premières heures (Figure 1), moins de 10% de la quantité totale de SA présente dans la formulation pour la plupart des formulations testées. Les conditions des tests de libération sont les conditions les plus critiques. La durée de 8h semble être adaptée aux conditions physiologiques chez l'Homme, cependant dans la littérature de nombreuses études raccourcissent le temps de passage dans le tampon phosphate 30 min ou 3h [18], [19]. Un séjour plus long peut prouver d'une meilleure façon la résistance de la libération de la SA de la formulation dans le HTGI.

Ce faible taux de libération est dû au caractère physiologique des polysaccharides utilisés, ainsi, un amidon résistant est un polysaccharide ni digéré dans l'estomac ni dans l'intestin grêle. Les amidons résistants peuvent être présents naturellement dans les plantes avec diverses structures, ou formés par rétrogradation quand les produits riches en amidons sont chauffés puis refroidis, ou sont chimiquement modifiés pour résister aux enzymes digestives (pour les structures qui ne sont présentes naturellement) [20]. L'association d'un polymère et d'un polysaccharide avec de l'éthylcellulose permet d'augmenter la libération de la SA dans le HTGI comparé aux formulations enrobées uniquement d'éthylcellulose. Cependant, les formulations 16 et 17 libèrent moins de 1% de 5-ASA et représentent les

formulations qui libèrent le moins. Seulement 2 formulations libèrent plus de 20% de 5-ASA en 8 heures (Figure 1). Plus la part de polysaccharides dans les enrobages formés d'éthylcellulose est importante, plus la SA est libérée (Figure 1). Ceci peut être expliquée par la solubilisation du polysaccharide dans le milieu de libération (Acide chlorhydrique et tampon phosphate). De plus, la libération de la SA diminue avec l'accroissement du niveau d'enrobage respectivement au ratio du mélange polysaccharide:EC (Figure 1). Cependant, un enrobage épais requiert plus de temps pour être solubilisé. Seule une formulation (F1) libère plus de 20% de 5-ASA en 8 heures (Figure 1). Toutes les formulations testées, enrobées avec un mélange de polymère et de polysaccharides résistants libèrent moins dans le HTGI simulé que l'Asacol® et le Pentasa® [9] (60% et 85% de libération de la SA est respectivement observée dans les mêmes conditions) d'où l'intérêt de l'utilisation potentielle de ces revêtements.

Parmi les formulations testées, toutes ont répondu aux exigences de faible taux de libération dans le HTGI.

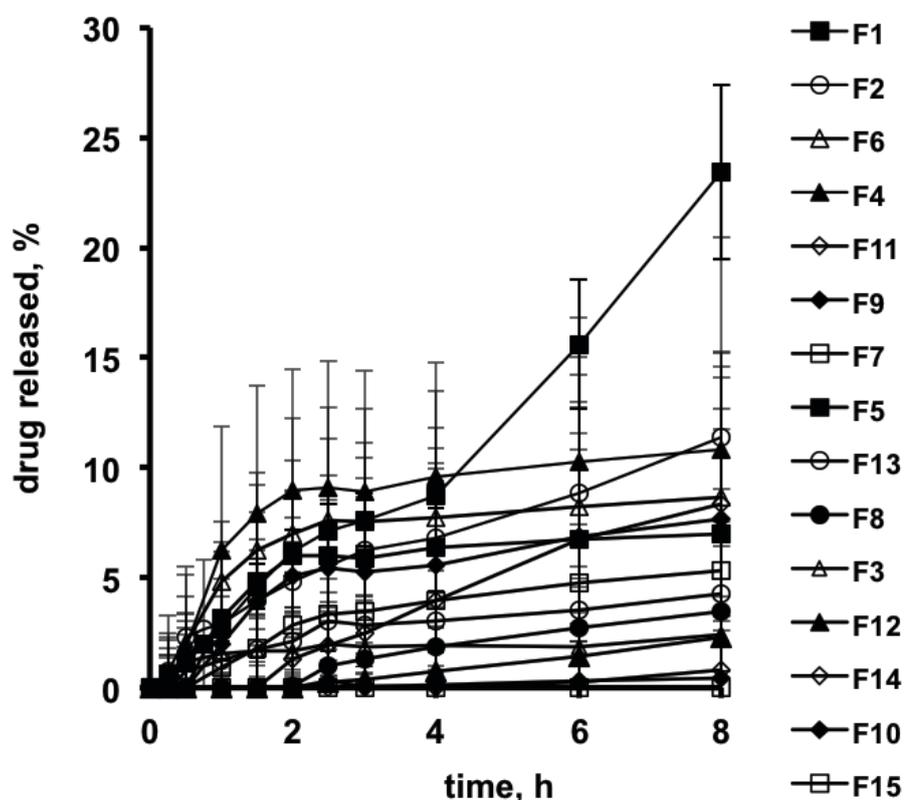


Figure 1: La libération in vitro de 5-ASA à partir de minigranules enrobées de divers mélanges décrits dans le tableau 1, dans des conditions simulant le transit à travers le HTGI (2h dans HCl pH 1,2 et 6 h dans du tampon phosphate pH 7,4).

Les formulations sélectionnées pour l'analyse des caractéristiques de libération de la SA dans les conditions simulant le côlon sont les formulations F1, F2, F3, F5, F6, F11 et F15. D'une part, ces formulations présentent un faible taux de libération dans le HTGI. D'autre part, un nombre limité de formulations, de polysaccharides, de ratio polymère : polysaccharides et de niveau d'enrobage a été sélectionné pour comparer l'effet de chaque facteur sur le taux de libération de la SA dans les conditions coliques.:

- Les formulations F1 et F2 sont composées du même polysaccharide (inuline) et niveau d'enrobage (20%) mais pas le même ratio polymère:polysaccharide (1:4 pour F1 et 1:5 pour F2);

- Les formulations F3, F5 et F6 sont composées du même polysaccharide (Actistar®), de différents ratios polymère:polysaccharide (1:2 pour F6; 1:3 pour F5 et 1:4 pour F3) et niveaux d'enrobage (15% pour F6 et 20% pour F3 et F5);

- LA formulation F11 est conçue avec un ratio polymère:polysaccharide et un niveau d'enrobage rencontrés avec la F6 (1:2 and 15%) mais avec un polysaccharide différent (PenFiber®),

- Enfin, la formulation F15 a été choisie comme contrôle de libération de la SA d'une formulation enrobée d'une suspension ne contenant aucun polysaccharide dans des conditions simulant le milieu colique.

2) La libération colique

Les selles de 23 patients ont été étudiées. Le tableau 2 expose les caractéristiques des patients. Cette population est relativement homogène, cependant le nombre d'échantillons reste limité. Ceci est dû à la difficulté de se procurer des selles fraîches de patients. Les échantillons de patients traités par antibiothérapie sont moins nombreux que ceux des patients non traités par antibiothérapie. Cette étude devrait être poursuivie pour augmenter la taille de la population étudiée. Les patients de consultation fournissaient des échantillons relativement régulièrement et de façon programmée et représentent la majeure partie du groupe de patients

non traités par ATB. La combinaison d'ATB utilisée était la même pour tous les patients traités: ciprofloxacine et métronidazole [21], [22], qui cible un spectre large de bactéries. La ciprofloxacine est active contre les bactéries Gram -positive, Gram-négative, et quelques bactéries anaérobies alors que le métronidazole touche seulement les bactéries anaérobies. La population de patients inclut plus de femmes et plus de patients atteints de MC que de RCH. Cependant, cette différence de distribution est observée dans les groupes « avec » et « sans ATB ». L'âge médian au prélèvement (44,65 et 40,88 ans pour les patients traités ou non par ATB) et l'âge au diagnostique (26,00 et 24,50 ans, respectivement) sont presque les mêmes pour les deux groupes, aussi, l'étendue des âges est relativement grande (26,17 à 71,90 ans pour l'âge médian au prélèvement et 13,00 à 62,00 pour l'âge médian au diagnostique). C'est un paramètre important parce que l'âge et les traitements anti-inflammatoires sont déjà connus pour avoir une influence sur la diversité de la microflore [23]. Les patients hospitalisés sont souvent en rechute aiguë et traités par des ATB, c'est pourquoi on observe une différence de distribution des échantillons provenant des deux groupes (traités ou non par ATB). De plus, nous observons une différence de ratio de patients ayant subi ou non de chirurgie telle que une résection entre les deux groupes. Cependant, les caractéristiques telles que les poussées inflammatoires, la résection d'une portion d'intestin ou l'utilisation d'ATB possède un effet similaire sur la flore bactérienne : la réduction de la diversité bactérienne dans le côlon.

Caractéristiques	Total	Patients sans antibiotique	Patients avec antibiotiques
Nombre de patients	23	17	6
Ratio hommes / femmes (ND pour 2 patients)	6/15	5/11	1/4
Ratio Maladie de Crohn / Rectocolite hémorragique (ND pour 2 patients)	17/4	12/4	5/0
Age médian au prélèvement [min; max] (ND pour 2 patients)	43.68 [26.17 ; 71.90]	44.65 [26.17 ; 71.90]	40.88 [27.97 ; 54.20]
Age médian au diagnostique (ND pour 2 patients)	26.00 [13.00 ; 62.00]	26.00 [19.00 ; 62.00]	24.50 [13.00 ; 32.00]
Ratio Hospitalisation / Consultation	11/12	5/12	6/0
Fumeurs au moment du prélèvement (ND pour 2 patients)	3	3	0
Antécédent de dépendance tabagique (ND pour 2 patients)	10	8	2
Patients ayant subi une intervention chirurgicale consistant en une résection de l'intestin (ND pour 2 patients)	11	7	4
Stade de la maladie de Crohn			
Total	17	12	5
Activité de la pathologie			
Patients en rémission	7	7	0
Patients avec une « pathologie modérément active »	3	1	2
Patients avec un « pathologie active sévère »	7	4	3
Localisation de la pathologie			
Iléale	2	2	0
Colique	5	3	2
Iléocolique	10	7	3
Caractéristiques de la pathologie			
Non-sténosante, non-pénétrante	10	7	3
Sténosante	4	3	1
Pénétrante	3	2	1
Stade de la rectocolite hémorragique			
Total	4	4	0
Activité de la pathologie			
Rémission	2	2	0
Pathologie active	2	2	0

Tableau 2: Caractéristiques des patient. (ND: Non documenté).

La Figure 2 montre le suivi de la libération du 5-ASA à partir de la formulation F2 dans un milieu de culture stérile (sans ajout de bactérie), dans les conditions simulant le HTGI. La libération est très faible (moins de 5% de la quantité totale de SA contenue dans la formulation) et représente un contrôle de l'action des enzymes bactériennes sur l'enrobage des formulations. En effet, l'environnement stérile est exempt d'enzyme bactérienne, ainsi, la libération de la SA est probablement due à la solubilisation de l'enrobage dans le milieu de dissolution. Ce test de libération ne pouvait pas être réalisé sur une période plus longue que 8 heures parce que les prélèvements étaient effectués dans une chambre anaérobie non stérile et par conséquent, des contaminations bactériennes auraient interféré dans les résultats de libération de SA observés.

Inuline : Ethylcellulose Ratio 1 : 5 ; Niveau d'enrobage 20%

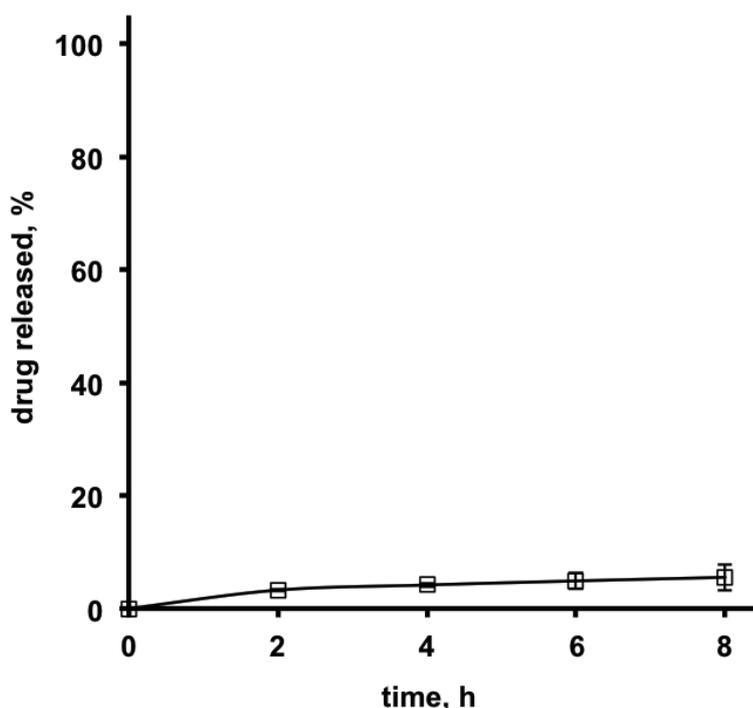


Figure 2: Libération *in vitro* de 5-ASA à partir de minigranules enrobées avec une dispersion aqueuse d'éthylcellulose à un niveau d'enrobage de 20% (F15), dans un milieu de culture stérile pendant 8h, après prétraitement pendant 10 heures dans un milieu simulant le HTGI (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 pendant 2h puis un tampon phosphate pH 7,4 pendant 8h) (pour plus de clarté, l'étape du HTGI n'est pas représentée sur cette figure).

Aussi, la libération de 5-ASA à partir de la formulation F15 dans un milieu de culture inoculé par des selles de patients non traités par des ATB, après un prétraitement dans des conditions simulant le HTGI montre une faible libération de SA (Figure 3). Une libération de SA de 4.17% de la totalité de SA contenue dans la formulation est libérée, ce qui révèle l'absence d'action des enzymes bactériennes sur les formulation enrobées uniquement d'éthylcellulose.

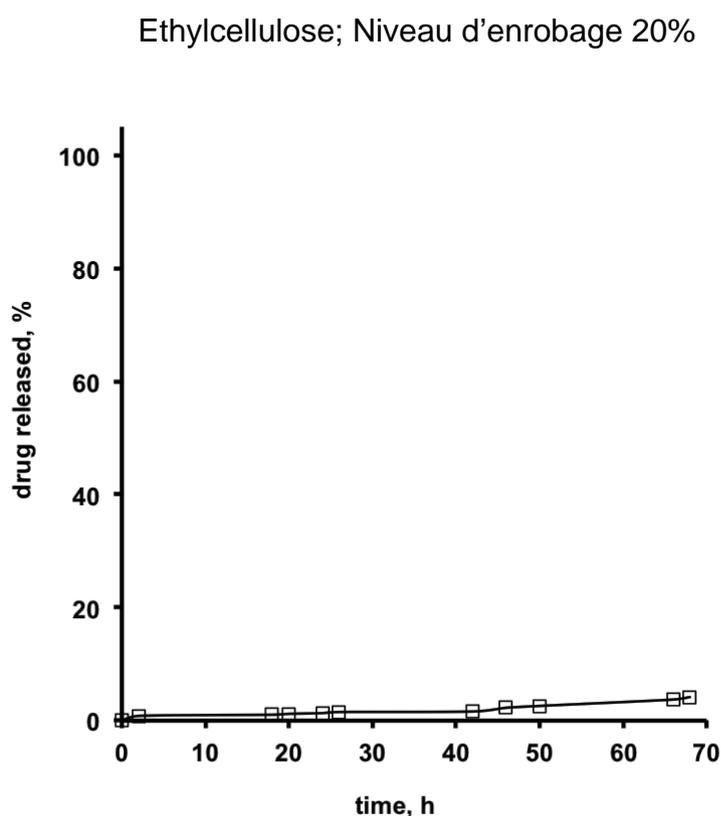


Figure 3: Libération *in vitro* de 5-ASA à partir de minigranules enrobées d'un mélange au ratio 1: 5 d'inuline : ethylcellulose au niveau d'enrobage de 20% (F2), dans un milieu de culture inoculé avec une selle de patient «sans antibiotique» pendant 68h, après prétraitement pendant 10 heures dans un milieu simulant le HTGI (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 pendant 2h suivi par un tampon phosphate pH 7,4 pendant 8h) (pour plus de clarté, l'étape du HTGI n'est pas représentée sur cette figure).

La libération de SA dans un milieu simulant le côlon consistant en un milieu de culture inoculé par une selle de patient non traité par ATB est représentée sur la Figure 4. Six formulations sélectionnées pour leur intérêt potentiel dans le ciblage colique de SA ont été étudiées. F1 montre une libération de SA plus faible que F2 qui est composée du même polysaccharide et niveau d'enrobage mais avec un ratio polymère:polysaccharide différent. La même conclusion peut être faite pour les formulations F3 et F5. Ainsi, plus la part de polysaccharide dans l'enrobage est importante, plus la SA est libérée. Ce phénomène est expliqué par l'utilisation du polysaccharide d'enrobage comme substrat pour les enzymes bactériennes présentes dans le milieu. Parmi les 6 formulations, quatre ont montré un faible taux de libération dans le milieu simulant le fluide colique avec moins de 20% de SA libérée après 68 heures d'exposition (F3, F5, F6 and F11). Ce faible taux de libération est aussi observé lorsque la part de polysaccharide dans le mélange d'enrobage augmente, ce qui peut être expliqué par le caractère résistant du polysaccharide et sa faible disponibilité pour les enzymes bactériennes. Actistar est composé de cristaux d'amylose [24] et les autres amidons utilisés sont décrits par leur fournisseurs comme des amidons modifiés. L'ampleur de la gélatinisation et de la rétrogradation sont des facteurs majeurs pour la digestion enzymatique des amidons et des propriétés fonctionnelles pour la fabrication des aliments [25]–[28]. Ainsi, le caractère non digestible des amidons utilisés dans les formulations de cette étude peut être dû à leur caractère résistant initial ou à des changements de degrés de gélification et rétrogradation causés par des étapes de formulation telles que le chauffage et le refroidissement.

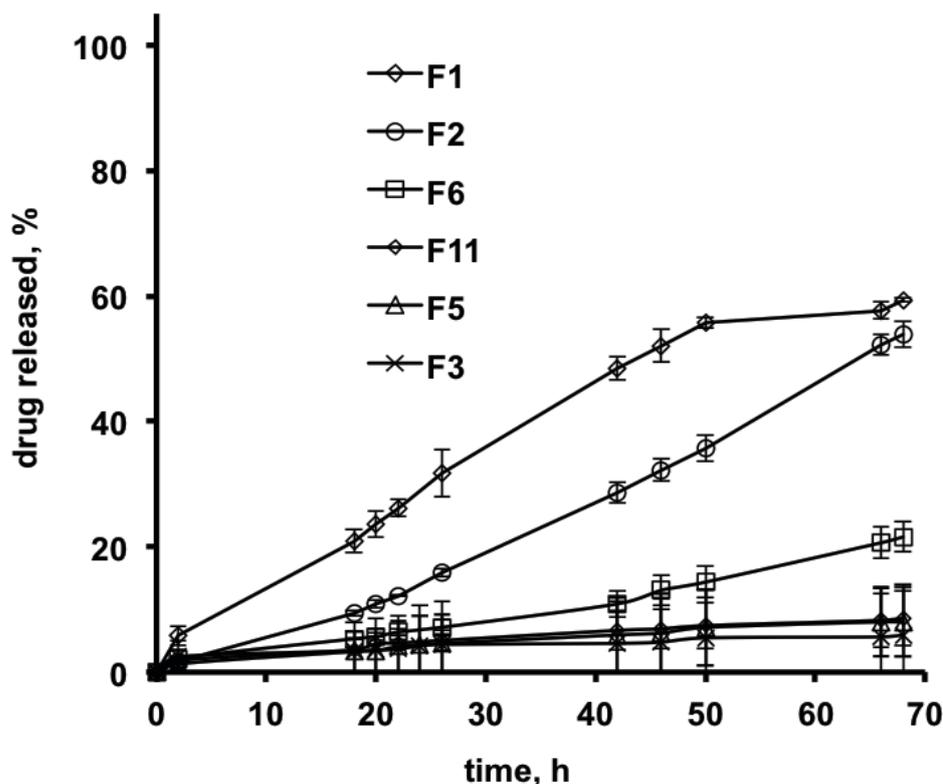


Figure 4: Libération *in vitro* de 5-ASA à partir des formulations de minigranules enrobées F3, F5, F6, F11 dans un milieu de culture ensemencé avec une selle de patient «sans antibiotique» pendant 68h, après un prétraitement pendant 10 heures dans un milieu simulant le HTGI (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 pendant 2h suivi par un tampon phosphate pH 7,4 pendant 8h) (pour plus de clarté, l'étape du HTGI n'est pas représenté sur cette figure).

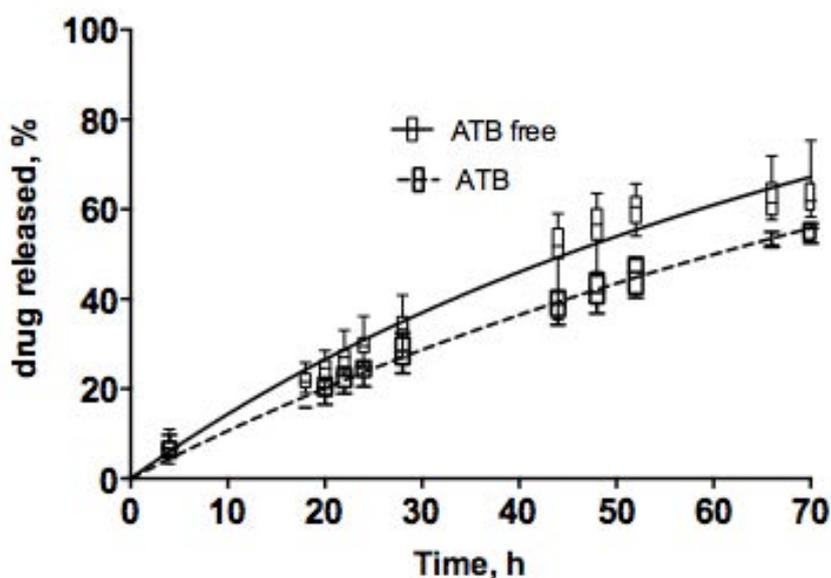
Ainsi, seules deux formulations (F1 and F2), qui montrent le taux de libération le plus élevé dans le milieu simulant le côlon (Figure 4) ont été sélectionnées pour être testées avec des selles de patients atteints de MICI traités ou non par ATB.

La Figure 5 montre une libération de 5-ASA *in vitro* à partir de minigranules enrobées avec les formulations F1 et F2 dans des conditions de simulation du côlon employant des selles de patients atteints de MICI éventuellement traités par des ATB. Les minigranules étaient prétraités durant 10 heures avec un milieu simulant le HTGI (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 durant 2h suivi d'un tampon phosphate pH 7,4 durant 8h).

Les représentations en boxplot nous permettent de visualiser la faible dispersion des résultats et la reproductibilité des échantillons fécaux utilisés. Nous observons une plus faible libération de SA lorsque les selles utilisées proviennent de patients traités par ATB. La libération de SA à partir de formulation composée d'inuline est considérable et atteint presque

80% après 78 heures (F1) (20% dans les conditions simulant le HTGI et 60% dans les conditions coliques). Il est largement connu que le niveau d'enrobage influence le taux de libération de la SA. En plus de cette étude, il a été observé que le ratio entre le polysaccharide et l'éthylcellulose avait un important effet sur le taux de libération de la SA. La formulation F1, qui possède un ratio polysaccharide: éthylcellulose de 1:4, libère la SA plus rapidement que F2 qui possède un ratio de 1:5, ce qui est dû à la plus grande proportion de polysaccharide disponible pour la digestion enzymatique.

Inuline : Ethylcellulose
Ratio 1 : 4 ; Niveau d'enrobage 20%



Ratio 1 : 5 Niveau d'enrobage 20%

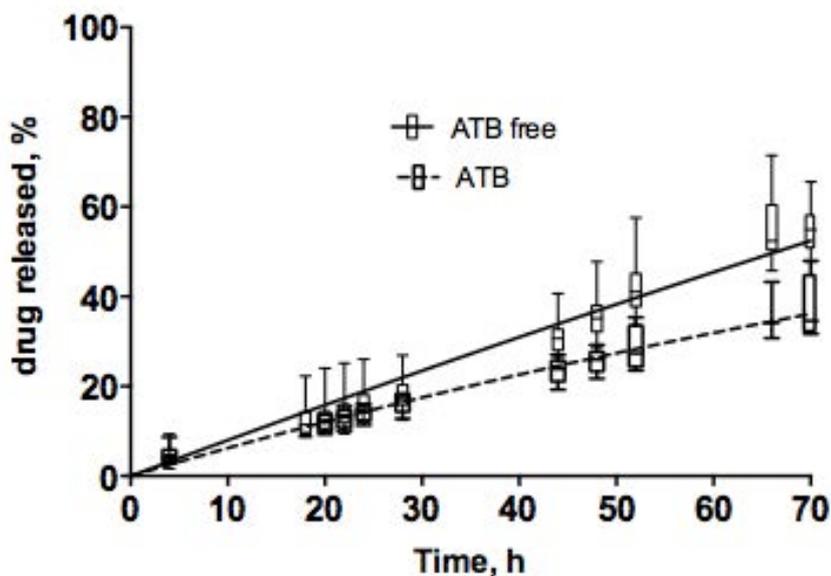


Figure 5: Libération *in vitro* de 5-ASA à partir de minigranules enrobées d'un mélange inuline :ethylcellulose, au ratio 1: 4 (en haut) et 1: 5 (en bas) et au niveau d'enrobage 20%, dans des conditions simulant le côlon consistant en des échantillons fécaux de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin traités avec des antibiotiques [« ATB » (courbe en pointillés)] ou non [« ATB free » (courbe pleine)] pendant 68h, après un prétraitement pendant 10 heures dans des conditions simulant le HTGI (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 pendant 2h suivi par un tampon phosphate pH 7,4 pendant 8h) (pour plus de clarté, l'étape du HTGI n'est pas représentée sur cette figure). Les taux de libération sont représentés sous forme de boîtes à moustaches pour étudier la dispersion des données.

3) Analyse statistique

L'analyse des taux de libération de la SA observés à 68 heures a montré une distribution normale des données (test Shapiro Wilk, $p > 0,05$) et le test statistique d'ANOVA a révélé une différence statistiquement significative de taux de libération final entre les formulations enrobées avec un mélange inuline:EC au ratio 1:4 et 1 :5 avec un niveau d'enrobage de 20% (F1 and F2) ($p < 0,05$). De plus, le test post-hoc de Tukey indique que l'enrobage Inuline:EC au ratio 1:4 avec un niveau d'enrobage de 20%, possède un taux final de libération au bout de 68 heures supérieur à la formulation F1

La comparaison du taux de libération final (T78h) entre les groupes de selles de « patients traités par ATB » et « non traités par ATB » a du être réalisé par un test statistique non paramétrique à cause du nombre de selles étudiées limité et donc la normalité de distribution des données ne pouvait pas être trouvée. Le test de Mann-Whitney montre que le taux de libération à 68h est significativement différent entre les résultats obtenus avec l'utilisation des selles de patients traités ou non par ATB ($p < 0,05$; $p = 0,013$). Ces tests ont également révélé la différence significative entre les groupes de selles de patients avec et sans traitement antibiotique quelle que soit la formulation étudiée (F1 or F2) ($p < 0,05$; $p = 0,001$).

Pour vérifier ces résultats, nous avons étudié la différence de taux de libération selon les deux formulations en séparant les matières fécales des populations de patients traités ou non avec des antibiotiques, ce qui a conduit à une différence de vitesse de libération significative pour chaque formulation analysée ($p < 0,05$).

Ces résultats soutiennent le fait que l'utilisation de ces formulations chez des patients traités par ATB est possible même si le taux de libération de la SA sera plus faible en comparaison avec celui qui serait observé chez des patients non traités par ATB. Ces résultats sont intéressants pour la population de patients atteints de MICI qui nécessite régulièrement une antibiothérapie.

Les entérobactéries sont présentes en quantité inférieure à la valeur seuil de détectabilité lorsque les patients sont traités avec des antibiotiques, ainsi, une variation significative dans le taux de libération du médicament a été observée par rapport aux patients «non traités».

4) Dénombrement bactérien

Dans la Figure 6 sont représentés les dénombrements bactériens des bactéries totales cultivables et des entérobactéries (UFC / g de selles) présentes dans les selles utilisées dans l'étude, de patients traités ou non par antibiothérapie. Comme attendu, les selles provenant de patients par ATB, contenaient moins de bactéries, ce qui prouve l'effet des ATB sur la microflore colique, et plus particulièrement sur les entérobactéries. Le dénombrement de la flore totale cultivable est 1000 fois plus faible pour les selles de patients traités par ATB (10^6 UFC / g de selles) comparé à celles des patients non traités (10^9 UFC / g de selles). Concernant les entérobactéries, nous observons une grande différence avec 10^7 UFC d'entérobactéries / g de selles de patients non traités par ATB. Ces entérobactéries ne sont pas exigeantes, elles ont un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif et son métabolisme est glycolytique, ce qui leur confère un rôle important pour la libération de SA à partir des enrobages des formulations étudiées.

La quantité de bactéries totales cultivables et d'entérobactéries augmente durant les 68 heures d'exposition des minigranules enrobées avec le milieu de culture inoculé de selles de patients traités ou non par des ATB (Figure 7). Le dénombrement des colonies de bactéries totales cultivables augmente de 10^5 à 10^7 UFC / 100 ml entre T0 et T68 heures pour les selles de patients « sans ATB » et de 10^4 à 10^6 UFC / 100 ml pour les selles de patients « avec ATB ». Le dénombrement des colonies d'entérobactéries augmente de 10^3 à 10^7 UFC / 100 ml entre T0 et T68 heures pour les selles de patients « sans ATB ». Les selles de patients « avec ATV » contiennent une quantité vraiment faible d'entérobactéries (les dénombrements médian restaient souvent sous le seuil de comptage).

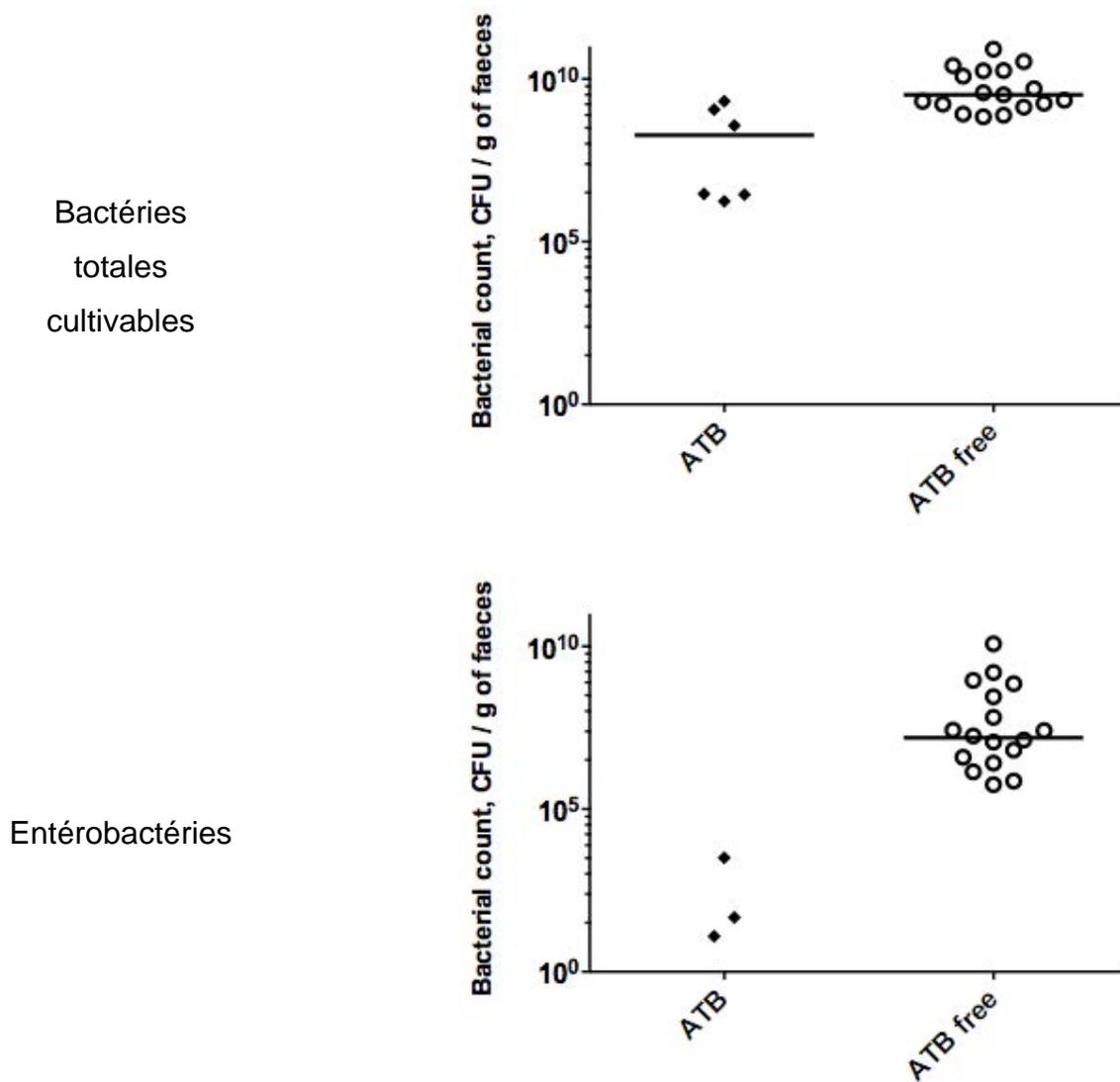


Figure 6: Dénombrements des bactéries totales cultivables (en haut) et des entérobactéries (en bas) dans les selles (UFC / g de matières fécales) des patients traités par des antibiotiques (côté gauche) ou sans antibiotique (côté droit).

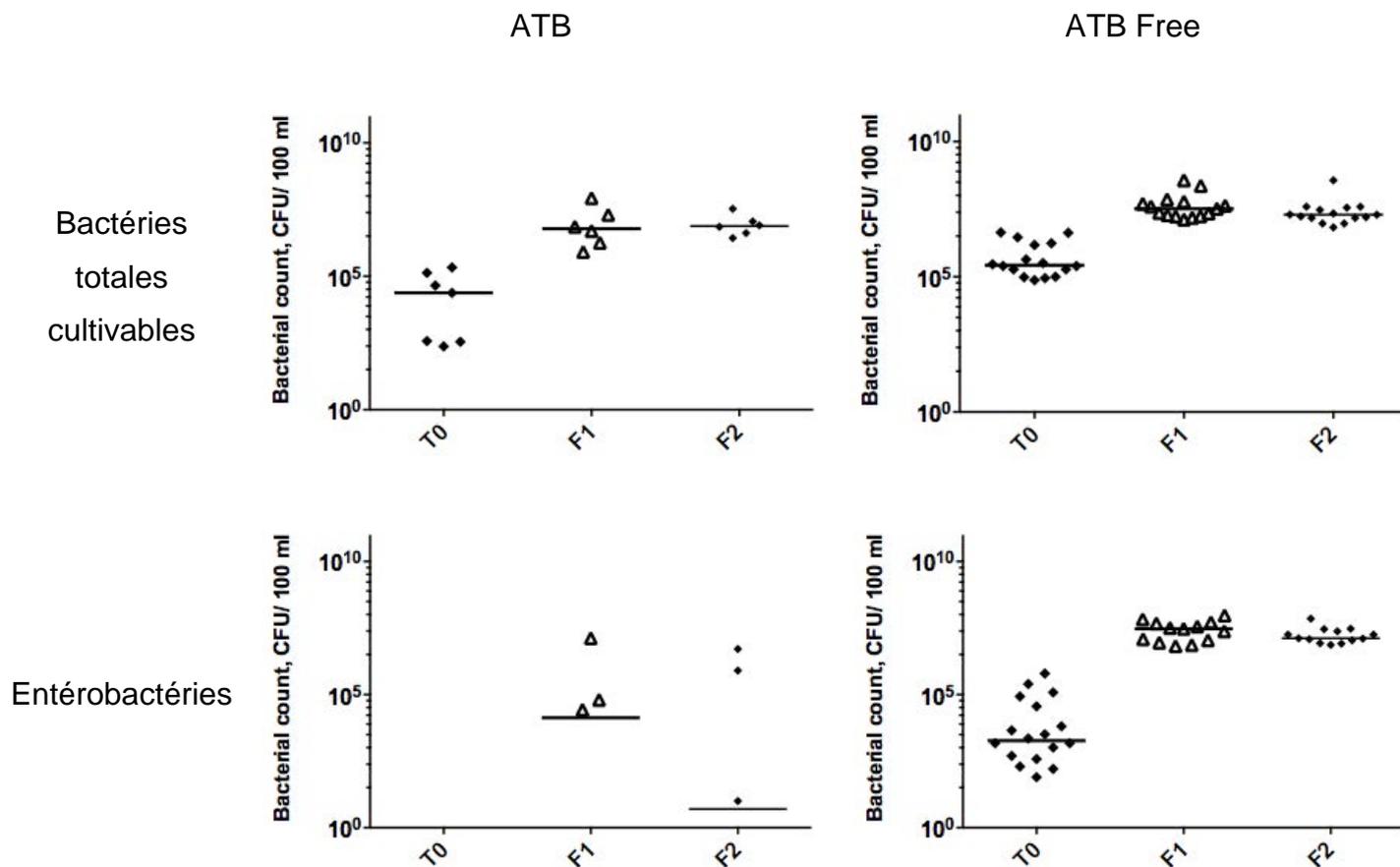


Figure 7: Dénombrement des bactéries totales cultivables (en haut) et des entérobactéries (en bas) présentes dans le milieu de culture (UFC / 100 ml) inoculés avec des selles de patients traités par des antibiotiques (côté gauche) ou sans antibiotique (à droite) au début test de libération (T0) et à la fin du test (68h) pour des formulations consistant en des minigranules de 5-ASA enrobées d'un mélange inuline :éthylcellulose un ratio 1: 4 (F1) et 1: 5 (F2) et avec un niveau d'enrobage de 20%.

Une identification bactérienne a été réalisée pour déterminer le type de bactérie pouvant utiliser les polysaccharides d'enrobage des formulations comme substrat. Ces bactéries isolées pourraient permettre de développer un mélange bactérien et une méthode standardisée pour mimer les conditions coliques dans les études de libération de SA à partir de formulation à ciblage colique sensibles aux enzymes bactériennes. Les bactéries d'intérêt sont donc des bactéries glycolytiques, prédominantes dans les selles de patients atteints de MICI et avec un potentiel pathogène faible. Ainsi, peu de types bactériens ont été isolés tels que *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* (par exemple *Bacteroides fragilis*), *Prevotella*, *Clostridium* (par exemple *Clostridium clostridioforme*), *Veillonella*, enterobactéries telles que *Escherichia coli* et *Klebsiella* (par exemple *Klebsiella pneumoniae*).

L'identification des bactéries présentes dans les selles de patients est assez variable, et la présence de nombreuses bactéries glycolytiques renforce l'approche de l'utilisation des enzymes bactériennes comme outils pour le ciblage colique des SA.

Les selles de patients traités par ATB possèdent une diversité bactérienne réduite qui est dominée par les *Lactobacillus*. Des levures, particulièrement *Candida albicans* ont été cultivées à partir de certaines selles. L'analyse des échantillons de selles fraîches de patients atteints de MICI nous a permis de nous approcher au plus près des conditions cliniques. Cette technique permet d'obtenir une libération de SA par les bactéries présentes dans le côlon des patients qui sont traités par ces thérapeutiques anti-inflammatoires. L'utilisation de selles fraîches de patients traités avec des ATB confirme ces résultats. Le taux de libération de la SA est plus faible en utilisant les selles de patients traités par ATB mais cette libération est tout de même significative. La libération de SA serait encore significative lorsque la quantité et la qualité de la flore intestinale des patients sont modifiées par les antibiotiques (ce qui est assez fréquent avec ce type de maladie).

Les dénombrements réalisés au début et à la fin du test de libération colique montrent une croissance bactérienne durant 68 heures. Ainsi, malgré la dilution et l'absence de sucre dans le milieu de culture, les bactéries sont capables d'utiliser les polysaccharides d'enrobage des formulations comme substrat. La dilution des selles et du milieu de culture montre que la production d'enzymes bactériennes digérant les polysaccharides d'enrobage est inductible. La dilution permet d'éviter la saturation du milieu par les bactéries. En effet, la croissance bactérienne peut être décomposée en trois phases : la phase de latence, la phase de croissance exponentielle et la phase de croissance stationnaire du à la saturation. Dans un milieu de culture non renouvelé comme celui utilisé dans cette étude, il est nécessaire de diluer l'échantillon fécal pour observer le comportement des bactéries au cours de la phase exponentielle de croissance.

L'utilisation d'enrobages composés de polysaccharides comme substrats pour la croissance bactérienne peut aussi être vérifié par la mesure du pH du milieu (la digestion des polysaccharides par les bactéries acidifie le milieu de culture) ou par la mesure d'un dégagement gazeux (dioxyde de carbone ou méthane par exemple), mais la quantité de polysaccharides dégradée est tellement faible que les caractéristiques physico-chimiques ne seraient pas observables.

La croissance bactérienne confirme le potentiel effet pré-biotique des polysaccharides utilisés. Cet effet serait utile pour améliorer le déséquilibre bactérien remarqué dans le côlon des patients atteints de MICI.

5) Souches isolées et mélange de souches isolées

La Figure 8 montre les courbes de libération de SA à partir des formulations F1 and F2 dans des conditions coliques consistant en un milieu de culture inoculé avec différents mélanges de souches bactériennes isolées à partir des selles de patients atteints de MICI. Les courbes de libération moyennes de SA des formulations dans les conditions coliques consistant en un milieu de culture inoculé avec des selles entières de patients atteints de MICI non traités par ATB sont représentées comme « contrôle de libération de la SA ». Nous observons que ces courbes de libération obtenues avec des mélanges bactériens sont très proches de celles obtenues avec les selles entières, sans les dépasser. Les mélanges bactériens semblent être capables de remplacer les selles fraîches entières de patients dans les études de libération de SA sans malheureusement être capables d'identifier un mélange plus efficace parmi ceux déjà testés. Mais cette méthode reste intéressante pour simplifier les tests de libération de SA dans les conditions coliques et pour standardiser les conditions opératoires.

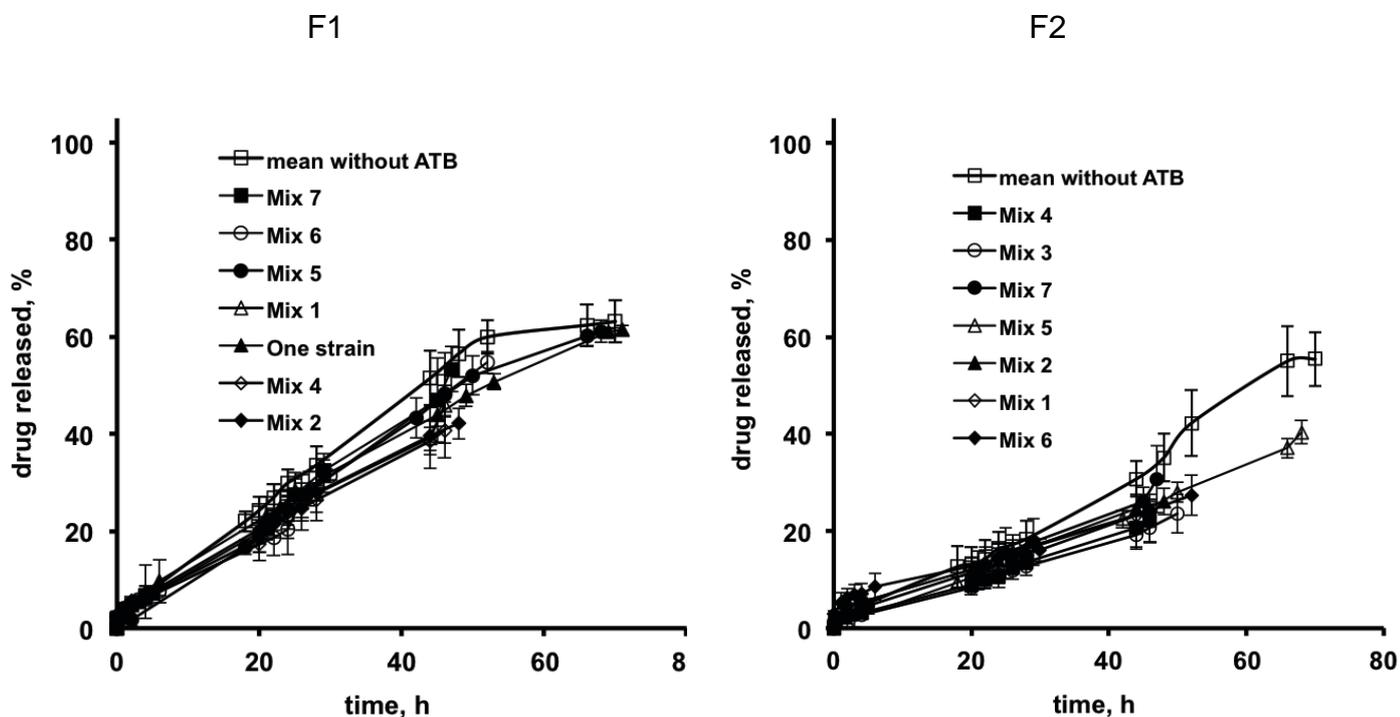


Figure 8: Libération *in vitro* de 5-ASA à partir de minigranules enrobées d'un mélange inuline :ethylcellulose au ratio 1: 4 (F1; en haut) et 1: 5 (F2; en bas) et avec un niveau d'enrobage de 20%; dans des conditions coliques simulées consistant en un milieu de culture inoculé par un mélange de souches bactériennes isolées à partir d'échantillons fécaux de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin traités ou non avec des antibiotiques (« mean without antibiotique» représentent la moyenne de libération de 5-ASA dans des conditions coliques simulées avec des échantillons fécaux de patients inflammatoires de l'intestin de maladies non traitées avec des antibiotiques). L'étape colique dure 48h à 68h selon le mélange, après un prétraitement pendant 10 heures dans des conditions de HTGI simulées (solution d'HCl 0,1 M pH 1,2 pendant 2 heures suivi par un tampon phosphate pH 7,4 pendant 8 h) (pour plus de clarté, l'étape de l'HTGI n'est pas reporté sur cette figure).

Mix1: Bacteroides ovatus Y70-15; 1 ml; Y71-3 Clostridium ramosum Y71-4 1 mL 1 mL Clostridium innocuum

Mix 2: Y63-4 Bacteroides stercoris 1 mL; Y52-2 E. coli 1 mL of dilution 10^{-1}

Mix 3: Y70-15 Bacteroides ovatus 1 mL; Y52-2 E. coli 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 4: Y70-15 Bacteroides ovatus 1 mL; Y52-2 E. coli 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 5: Y80-6 Bifide 1 mL; Y82-1 E. coli 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 6: Y89-1 E. coli 1 ml dilution 10^{-1} ; Y89-2 Bacteroides 1 ml

Mix 7: Y90-13 Ruminococcus 1 ml; Y91-1 E.Coli 1ml dilution 10^{-1}

6) Perspectives

Il serait intéressant d'analyser la production d'enzymes par les bactéries coliques en utilisant une solution de polysaccharide pure comme substrat. Ceci peut être réalisé par l'étude de la croissance bactérienne et par le suivi de l'acidification (due à la fermentation de saccharide), dans un milieu de culture enrichi avec le polysaccharide d'intérêt. Il serait également possible avec cette technique de cibler les souches bactériennes responsables de la digestion des polysaccharides dans la flore fécale et ainsi d'aider à l'élaboration du mélange bactérien standardisée pour le test de libération de la SA. Le mélange standardisé de bactéries pourrait éventuellement être utilisé dans un système de dissolution mimant la totalité du TGI comme le système SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem = Simulateur de l'écosystème microbien intestinal humain) [29]–[31].

Le criblage de polysaccharides candidats pour le développement de formulations à libération ciblée colique de SA peut être réalisé en étudiant des films composés de mélanges de polysaccharide: polymère. Différents paramètres peuvent être mesurés sur ces films tels que la perte en masse, la prise en eau, le caractère fermentescible par les bactéries fécales [32] ou les mélanges bactériens ou encore la diffusion de la SA à travers le film. Par la suite, il est possible d'apprécier la libération du médicament à travers des films contenant des SA. L'inconvénient de l'utilisation des films est la difficulté de corréler les propriétés des films et des enrobages (dont l'épaisseur est extrêmement faible).

Il serait intéressant d'évaluer d'autres polymères et plastifiants pour optimiser les formulations. Des systèmes multicouches avec des couches de SA pourraient être évalués [33]. Cependant ces systèmes de libération colique de SA ne tendent pas vers une simplification de la fabrication des nouvelles formulations.

La structure de l'enrobage des minigranules pourrait être étudiée par différentes technologies telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) [34], [35] ou l'imagerie à térahertz pulsée ou terahertz pulsed imaging [36], [37]. Celles-ci permettraient de vérifier l'intégrité de la couche d'enrobage avant de tester la dissolution et d'évaluer les dommages causés par les enzymes bactériennes sur l'enrobage.

Les enrobages développés pourraient être utilisés pour la formulation de micro ou nanoparticules [38], [39]. Leur utilisation avec d'autres médicaments, des combinaisons de médicaments, des SA lipophiles ou volatils devrait également être vérifiée.

La libération de SA à partir de formulation peut enfin être affinée en ciblant la libération vers une partie spécifique du côlon, basé sur les populations microbiennes spécifiques selon l'endroit ciblé.

Ces formulations sont destinées à être évaluées *in vivo* chez l'animal et éventuellement chez l'homme. De nombreuses études ont été menées sur des rats ou des souris pour des formulations similaires. Karrou et al. ont prouvé la supériorité d'un film d'enrobage sensible aux enzymes bactériennes composé d'un mélange de Nutriose:EC et de peas starch:EC destiné au ciblage colique *in vivo*, chez le modèle de rat et de souris en comparaison avec l'Asacol® [40].

IV. Conclusions

Les stratégies utilisées pour cibler la libération du médicament à partir de minigranules enrobées et les méthodes utilisées pour l'analyse de la libération de la SA à partir de ces formulations sont nombreuses et variées. Dans ce travail, une méthode de test de libération du PA à partir de formulation à ciblage colique a été développée. La technique utilisée a prouvé sa reproductibilité et son caractère discriminant pour deux formulations testées. Elle possède de nombreux avantages par rapport aux autres techniques utilisées dans la littérature, y compris l'utilisation de matières fécales de patients atteints de MICI, qui était pour l'instant l'approche la plus proche pour imiter la flore des patients traités par ces thérapies.

Cette étude a permis d'identifier, parmi les amidons résistants, l'inuline, qui a présenté la meilleure libération de SA dans le côlon lorsqu'il est inclus dans un enrobage à base d'éthylcellulose. La comparaison des résultats de libération de SA obtenues par des matières fécales de patients éventuellement traités avec des antibiotiques, a permis de montrer que ces formulations peuvent être efficaces même si des antibiotiques étaient co-administrés alors que ces traitements affectent légèrement le taux final de libération de la SA. Enfin, l'étude de la croissance bactérienne pendant le test de libération est en faveur d'un effet prébiotique potentiel du polysaccharide utilisé dans les formulations testées.

L'industrie pharmaceutique est incitée à développer de nouvelles formes pharmaceutiques en accord avec les demandes des médecins spécialistes, avec des doses appropriées et les effets indésirables évités. Le développement de nouvelles options

thérapeutiques pour le traitement des MICI nécessite le développement de nouvelles formulations qui doivent être testées d'une manière reproductible et rapide. La standardisation de ces tests permettrait d'éviter des biais comme ceux observés dans de nombreuses études. La méthode utilisant les matières fécales de patients atteints de MICI qui a été utilisée dans cette étude semble être l'une des méthodes les plus réalistes qui permet la normalisation. Cependant, l'optimisation d'un mélange bactérien permettant de standardiser la méthode de dissolution serait un moyen efficace d'accélérer les essais de ces nouveaux traitements pour le ciblage colique de la libération de SA.

Les perspectives pour la création de nouvelles combinaisons de molécules thérapeutiques ou le développement de nouvelles formulations à base de polysaccharides sont réalisables relativement rapidement avec ce nouveau test de dissolution colique, mais des tests *in vivo* sont encore nécessaires afin de prouver la corrélation avec les résultats *in vitro*, l'efficacité et l'innocuité de ces nouvelles formulations.

V. References

- [1] S. V. Kane, « Systematic review: adherence issues in the treatment of ulcerative colitis », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no 5, p. 577-585, mars 2006.
- [2] D. K. Bodger, « Cost Effectiveness of Treatments for Inflammatory Bowel Disease », *PharmacoEconomics*, vol. 29, no 5, p. 387-401, mai 2011.
- [3] C. N. Bernstein, M. Fried, J. h. Krabshuis, H. Cohen, R. Eliakim, S. Fedail, R. Gearry, K. I. Goh, S. Hamid, A. G. Khan, A. w. LeMair, Malfertheiner, Q. Ouyang, J. f. Rey, A. Sood, F. Steinwurz, O. O. Thomsen, A. Thomson, et G. Watermeyer, « World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010 », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 16, no 1, p. 112-124, janv. 2010.
- [4] B. Xiao et D. Merlin, « Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no 11, p. 1393-1407, nov. 2012.
- [5] M. M. Patel, « Getting into the colon: approaches to target colorectal cancer », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no 9, p. 1343-1350, sept. 2014.
- [6] A. Maroni, M. D. Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral colon delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 372-394, déc. 2013.
- [7] M. K. Chourasia et S. K. Jain, « Polysaccharides for colon targeted drug delivery », *Drug Deliv.*, vol. 11, no 2, p. 129-148, avr. 2004.
- [8] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, et P. K. Sharma, « Novel prospective in colon specific drug delivery system », *Polim. Med.*, vol. 44, no 2, p. 109-118, juin 2014.
- [9] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [10] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [11] W. R. Best, « Predicting the Crohn's disease activity index from the harvey-bradshaw index », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 12, no 4, p. 304-310, avr. 2006.
- [12] J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire, et J.-F. Colombel, « The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications », *Gut*, vol. 55, no 6, p. 749-753, janv. 2006.
- [13] L. M. Spekhorst, M. C. Visschedijk, R. Alberts, E. A. Festen, E.-J. van der Wouden, G. Dijkstra, et R. K. W. D. I. O. C. A. C. Icc, « Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, no 41, p. 15374-15381, nov. 2014.

- [14] J. D. Lewis, S. Chuai, L. Nessel, G. R. Lichtenstein, F. N. Aberra, et J. H. Ellenberg, « Use of the noninvasive components of the mayo score to assess clinical response in Ulcerative Colitis », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 14, no 12, p. 1660-1666, déc. 2008.
- [15] S. P. L. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, M. Lémann, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, W. Reinisch, B. E. Sands, B. R. Yacyshyn, C. A. Bernhardt, J.-Y. Mary, et W. J. Sandborn, « Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) », *Gut*, vol. 61, no 4, p. 535-542, avr. 2012.
- [16] S. P. L. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, W. Reinisch, B. E. Sands, B. R. Yacyshyn, P. Schnell, C. A. Bernhardt, J.-Y. Mary, et W. J. Sandborn, « Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity », *Gastroenterology*, vol. 145, no 5, p. 987-995, nov. 2013.
- [17] C. Neut, P. Bulois, P. Desreumaux, J.-M. Membreé, E. Lederman, L. Gambiez, A. Cortot, P. Quandalle, H. van Kruiningen, et J.-F. Colombel, « Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 97, no 4, p. 939-946, avr. 2002.
- [18] M. D. Del Curto, A. Maroni, L. Palugan, L. Zema, A. Gazzaniga, et M. E. Sangalli, « Oral delivery system for two-pulse colonic release of protein drugs and protease inhibitor/absorption enhancer compounds », *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no 8, p. 3251-3259, 2011.
- [19] S. Klein, M. W. Rudolph, B. Skalsky, H.-U. Peterleit, et J. B. Dressman, « Use of the BioDis to generate a physiologically relevant IVIVC », *J. Controlled Release*, vol. 130, no 3, p. 216-219, sept. 2008.
- [20] M. g. Sajilata, R. S. Singhal, et P. R. Kulkarni, « Resistant Starch—A Review », *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 5, no 1, p. 1-17, janv. 2006.
- [21] H. F. Hammer, « Gut microbiota and inflammatory bowel disease », *Dig. Dis. Basel Switz.*, vol. 29, no 6, p. 550-553, 2011.
- [22] K. J. Khan, T. A. Ullman, A. C. Ford, M. T. Abreu, A. Abadir, A. Abadir, J. K. Marshall, N. J. Talley, et P. Moayyedi, « Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 106, no 4, p. 661-673, avr. 2011.
- [23] H. Mäkituokko, K. Tiihonen, S. Tynkkynen, L. Paulin, et N. Rautonen, « The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition », *Br. J. Nutr.*, vol. 103, no 2, p. 227-234, janv. 2010.
- [24] J. Hasjim et J. Jane, « Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch », *J. Food Sci.*, vol. 74, no 7, p. C556-C562, sept. 2009.
- [25] S. Wang et L. Copeland, « Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review », *Food Funct.*, vol. 4, no 11, p. 1564, 2013.

- [26] P. Arranz-Martínez, K. Srikaeo, et A. L. González-Sánchez, « Effects of non-starch polysaccharides on physicochemical properties and *in vitro* starch digestibility of rice starches », *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, vol. 4, no 1, p. 6-15, juill. 2014.
- [27] R. Hoover, « The Impact of Heat-Moisture Treatment on Molecular Structures and Properties of Starches Isolated from Different Botanical Sources », *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no 9, p. 835-847, sept. 2010.
- [28] J. Singh, L. Kaur, et H. Singh, « Food microstructure and starch digestion », *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 70, p. 137-179, 2013.
- [29] S. D. Siciliano, B. D. Laird, et C. L. Lemieux, « Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands », *Chemosphere*, vol. 80, no 9, p. 1101-1108, août 2010.
- [30] P. Allsopp, S. Possemiers, D. Campbell, I. S. Oyarzábal, C. Gill, et I. Rowland, « An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity », *Anaerobe*, vol. 22, p. 38-44, août 2013.
- [31] S. Worametrachanon, A. Apichartsrangkoon, P. Chaikham, P. Van den Abbeele, T. Van de Wiele, et T. I. Wirjantoro, « Effect of encapsulated *Lactobacillus casei* 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no 11, p. 5241-5250, juin 2014.
- [32] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepman, L. Deremaux, P. Desreumaux, et J. Siepman, « Characterization of ethylcellulose: starch-based film coatings for colon targeting », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 35, no 10, p. 1190-1200, oct. 2009.
- [33] B. Dekyndt, J. Verin, C. Neut, F. Siepman, et J. Siepman, « How to easily provide zero order release of freely soluble drugs from coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 478, no 1, p. 31-38, janv. 2015.
- [34] S. Muschert, F. Siepman, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no 1, p. 130-137, mai 2009.
- [35] S. Muschert, F. Siepman, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets », *J. Controlled Release*, vol. 135, no 1, p. 71-79, avr. 2009.
- [36] M. Haaser, Y. Karrout, C. Velghe, Y. Cuppok, K. C. Gordon, M. Pepper, J. Siepman, T. Rades, P. F. Taday, et C. J. Strachan, « Application of terahertz pulsed imaging to analyse film coating characteristics of sustained-release coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 521-526, déc. 2013.
- [37] L. Ho, Y. Cuppok, S. Muschert, K. C. Gordon, M. Pepper, Y. Shen, F. Siepman, J. Siepman, P. F. Taday, et T. Rades, « Effects of film coating thickness and drug layer uniformity on *in vitro* drug release from sustained-release coated pellets: A case study using terahertz pulsed imaging », *Int. J. Pharm.*, vol. 382, no 1-2, p. 151-159, déc. 2009.
- [38] Nidhi, M. Rashid, V. Kaur, S. S. Hallan, S. Sharma, et N. Mishra, « Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review », *Saudi Pharm. J.*

[39] A. Sosnik, J. das Neves, et B. Sarmiento, « Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review », *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no 12, p. 2030-2075, déc. 2014.

[40] Y. Karrout, L. Dubuquoy, C. Piveteau, F. Siepmann, E. Moussa, D. Wils, T. Beghyn, C. Neut, M.-P. Flament, L. Guerin-Deremaux, L. Dubreuil, B. Deprez, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « *In vivo* efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy », *J. Controlled Release*.

Conclusion intermédiaire

Les stratégies utilisées pour cibler la libération du PA au niveau du colon à partir de minigranules enrobées et les méthodes utilisées pour l'analyse de la libération sont nombreuses et variées. Dans ce travail, une méthode de test de la libération colique ciblée a été développée. La technique utilisée a prouvé sa reproductibilité, son caractère discriminant pour deux formulations testées, et ses nombreux avantages par rapport aux autres techniques utilisées dans la littérature. L'utilisation de matières fécales de patients atteints de MICI est pour l'instant l'approche la plus réaliste pour mimer la flore des patients traités pour ces pathologies.

Cette étude a permis d'identifier, parmi les amidons résistants, l'inuline comme candidat pour l'élaboration de formulation à libération colique. Les formulations enrobées d'un mélange du polysaccharide et de l'éthylcellulose ont obtenu le meilleur taux de libération au niveau du côlon. La comparaison des résultats de libération obtenus par l'utilisation des matières fécales de patients traités et non traités avec des antibiotiques, montre que ces formulations peuvent être efficaces en cas de co-administration de traitements antibiotiques, bien que ceux-ci affectent légèrement le taux de libération final du médicament. Enfin, l'étude de la croissance bactérienne pendant le test de libération est en faveur d'un potentiel effet prébiotique du polysaccharide présent dans les formulations testées.

L'industrie pharmaceutique est sollicitée pour élaborer de nouvelles formes pharmaceutiques correspondant aux demandes des praticiens, avec des dosages adaptés et des effets indésirables évités. L'élaboration de nouvelles alternatives thérapeutiques pour les traitements des MICI passe par le développement de nouvelles formulations qu'il faut tester de manière reproductible et rapide. La standardisation de ces tests permettrait d'éviter les biais observés entre les différentes études. La méthode utilisant les selles de patients atteints de MICI que nous avons expérimentée dans cette étude semble être une des méthodes les plus réalistes qui permettrait une standardisation. Néanmoins, l'optimisation d'un mélange bactérien serait un moyen de tester plus rapidement ces nouvelles thérapeutiques à libération ciblée. Des perspectives de création de nouvelles associations de molécules thérapeutiques ou d'élaboration de nouvelles formulations à partir de polysaccharides seraient réalisables relativement rapidement grâce à ce nouvel outil de dissolution. Des tests *in vivo* sont néanmoins indispensables pour vérifier la corrélation avec les résultats obtenus *in vitro*, l'efficacité et l'innocuité de ces nouvelles formulations.

Chapitre 3

Comment obtenir, d'une manière relativement simple, une libération d'ordre zéro de principes actifs très solubles à partir de formes solides enrobées

Présentation

Les thérapeutiques peuvent être significativement améliorée par une libération prolongée des principes actifs notamment pour les traitements à courte demie-vie biologique nécessitant plusieurs prises médicamenteuses par jour. Cette libération prolongée est plus facilement obtenue avec des formulations solides et enrobées, à administration orale. L'élaboration de ces formes galéniques n'est pas toujours aisée et la transposition à l'échelle industrielle peut être très difficile. C'est pourquoi la recherche de formulations à transposition industrielle facile devient une priorité pour l'élaboration de nouvelles formes galéniques.

Dans cette étude, une nouvelle approche, basée sur une succession de couches de PA et de polymères (initialement dépourvu de PA) présentant une distribution initiale de PA non homogène, associée à un effet de temps de latence et à une diffusion partielle initiale à travers le noyau de la minigranule a été évaluée. Des variations de type, de quantité, d'épaisseur et de séquence des couches de PA et de polymères ont été testées afin d'obtenir une libération de principe actif d'ordre zéro sur 8 heures. L'utilisation de simples procédés d'enrobage rend ces formes facilement transferrables à la production industrielle.

I. Introduction

Les enrobages composés de polymère offrent un grand potentiel pour la libération contrôlée de médicaments par voie orale [1]. De nombreux produits consistant en des formes solides enrobés (comprimés, granules, gélules) sont mis sur le marché. Le bon choix du polymère utilisé, les techniques d'enrobage et les substrats revêtus permettent de fournir une grande gamme de profils de libération de substance active (SA) stable à long terme [2]–[5]. Elles incluent par exemple la libération pulsatile de SA [6], la libération ciblée au niveau du côlon [7] et la libération à vitesse constante (aussi appelée libération d'ordre zéro). Ce dernier type de profil de libération de médicament est fréquemment utilisée pour compenser l'élimination du médicament hors du corps humain de manière à fournir des concentrations de SA constante au niveau du site d'action.

Dans le cas de SA présentant une solubilité dans l'eau limitée, de telles vitesses constantes de libération peuvent par exemple être obtenues en utilisant les systèmes de réservoirs enrobés: la SA se situe dans le noyau du système qui est enrobé par un enrobage insoluble dans l'eau. Ce dernier est souvent d'un polymère et il contrôle la libération de la SA. Une fois la formulation mise en contact avec les fluides aqueux physiologiques, l'eau pénètre dans le système et dissout la SA. LA totalité de la quantité de SA ne peut pas se dissoudre instantanément étant donné que la solubilité du médicament est limitée. Ainsi, les formes de SA dissoute et non dissoute coexistent dans le noyau du système. Les molécules dissoutes (ou ions) sont disponibles pour la diffusion et, grâce au gradient de concentration, diffusent à travers l'enrobage de la formulation. Souvent, cette étape de transport de masse par diffusion joue un rôle majeur pour le contrôle de la libération de la SA [8], [9]. Etant donné que la dissolution de la SA est généralement plus rapide que la diffusion à travers l'enrobage, les molécules médicamenteuses (ions) libérées sont rapidement remplacées par la dissolution du reste de l'excès non dissouts. Ainsi, une concentration constante de SA dissoute (une solution saturée) est présente au sein du système aussi longtemps que la SA non dissoute reste en excès. Si la concentration de SA à l'extérieur de la formulation est négligeable, cela entraîne la formation d'un gradient de concentration de la SA constant. Si la couche d'enrobage ne se dissout pas, ne gonfle pas, ne s'érode pas ou autre changement observable avec le temps, et si la longueur des voies de diffusion et la mobilité de la SA dans la membrane de d'enrobage reste constante, la vitesse de libération de la SA resterait constante.

Au contraire, si la SA est très soluble dans l'eau (ou si la charge en SA est suffisamment faible), toute la quantité de SA est rapidement solubilisée par pénétration de l'eau dans le système. Ainsi, les molécules de SA (ions) libérées ne sont pas remplacées et la concentration en SA à l'intérieur de la formulation diminue avec le temps. Ceci conduit à une vitesse de libération de la SA qui diminue avec le temps. Différentes approches ont été suggérées pour surmonter cet obstacle [10]–[15]. Beaucoup utilisent des systèmes matriciels (tels que des comprimés multicouches [16]–[19]), des pompes osmotiques [20] et/ou des dispositifs possédant une géométrie particulière c'est-à-dire des hémisphères perforées d'un orifice central [21], [22], des comprimés biconcaves [23], ou des systèmes en forme de beignets [24]. Vraiment peu d'études font référence à des formulations de géométrie standard, telles que des minigranules, enrobées. Un système intéressant a été proposé par Scott and Hollenbeck (1991) [25]: un noyau de minigranule, recouvert de couches d'enrobage contenant la SA à différentes concentrations. La concentration de la SA de ces strates augmente vers la base du système pour compenser l'allongement des voies de diffusion. Un modèle était présenté pour calculer un profil de concentration de SA optimal. Cependant, l'épaisseur d'enrobage totale, dans ce cas était d'environ 400%, ce qui reste difficile à élaborer à l'échelle industrielle. Etant donné que les matrices polymériques chargées de SA représentent environ 80% de la masse totale du système (et le noyau seulement 20 %), ce système est en fait plus un système de libération de type matriciel qu'un dispositif réservoir enrobé.

Dans cette étude, nous présentons une nouvelle approche pour obtenir une vitesse de libération constante de SA fortement hydrosoluble à partir de minigranules enrobées : des couches successives de SA et de polymères ont été appliquées sur des noyaux de sucre ou de cellulose microcristalline (CMC). Le succinate de metoprolol a été utilisé comme SA fortement hydrosoluble et l'éthylcellulose et le poly(vinyl acetate) comme polymère contrôlant la libération [26]–[28]. La charge de SA initiale est intentionnellement faible (5 %) pour minimiser le potentiel effet de saturation et assurer un réel déficit de formulation. Le type, le nombre et la séquence des couches de SA et de polymères ont été variés. L'idée de base était d'obtenir différents types de distributions de SA initiales non-homogènes, avec des effets temps de latence initial et de diffusion partielle du SA vers le noyau de la minigranule, qui, rassemblées, permettraient d'obtenir une libération de SA presque constante pendant une grande partie de la période de libération.

II. Matériel et méthodes

1) Matériels

Succinate de Metoprolol et propranolol hydrochloride (Safic Alcan, Puteaux, France); noyaux de sucre (710 – 850 µm de diamètre, Suglets; NP Pharm, Bazainville, France); noyaux de cellulose microcristalline (noyaux de CMC, 710 - 850 µm de diamètre, Celphere; Seppic, Puteaux, France); hydroxypropyle methylcellulose (HPMC, Methocel E5; Colorcon, Dartford, UK); dispersion aqueuse d'éthylcellulose (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymers, Brussels, Belgique); dispersion aqueuse de poly(vinyl acetate) [Kollicoat SR 30D, contenant 27 % poly(vinyl acetate), 2.7 % poly(vinyl pyrrolidone), 0.3 % sodium lauryl sulphate and 70 % eau; BASF, Ludwigshafen, Germany]; triéthyle citrate (Morflex, Greensboro, USA).

2) Préparation des minigranules enrobés

Les noyaux de sucre et de CMC ont été successivement enrobés de couches de SA et de polymères (comme indiqué) dans un lit d'air fluidisé muni d'un insert Wurster (Strea 1; Niro, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suisse). Pour l'enrobage de SA, Une solution aqueuse de succinate de métoprolol ou d'hydrochlorate de propranolol à 31.3 % (w:w) contenant de l'HPMC (liant) à 8.7 % (w:w) était pulvérisée, suivant les conditions suivantes : température d'entrée = 30 °C, température du produit = 30 ± 2 °C, vitesse de pulvérisation = 1.5 – 3 g/min, pression de pulvérisation = 1.2 bar, volume d'air = 100 m³/h, diamètre de la buse de pulvérisation = 0.8 mm. Une fois la charge de SA voulue atteinte, les minigranules étaient séchées dans le lit d'air fluidisé encore 10 min sans pulvérisation de liquide. La dispersion aqueuse d'éthylcellulose était d'abord diluée dans de l'eau purifiée à une concentration de 15 % (w/w) de masse solide et plastifiée une nuit avec 25% de (w/w, concentration basée sur la masse de polymère) sous agitation magnétique. Les conditions suivantes étaient utilisées : température de l'air à l'entrée = 35 °C, température du produit = 35 ± 2 °C, vitesse de pulvérisation = 1,5 - 3 g/min, pression de pulvérisation = 1,2 bar, volume d'air = 100 m³/h, diamètre de la buse de pulvérisation = 0,8 mm. Une fois le niveau d'enrobage désiré atteint, les minigranules étaient séchées dans le lit d'air fluidisé sans pulvérisation de liquide durant 10 min. La dispersion de poly(vinyle acétate) était d'abord diluée avec de l'eau purifiée à 7.5 % (w/w) de masse solide et plastifiée une nuit avec 10% de (w/w, concentration basée sur la masse de polymère) sous agitation magnétique. Les conditions suivantes étaient

appliquées : température de l'air à l'entrée = 30 °C, température du produit = 30 ± 2 °C, vitesse de pulvérisation = 1.5 - 3 g/min, pression de pulvérisation = 1.2 bar, volume d'air = 100 m³/h, diamètre de la buse de pulvérisation = 0.8 mm. Une fois le niveau d'enrobage désiré atteint, les minigranules étaient séchées dans le lit d'air fluidisé sans pulvérisation de liquide durant 10 min. Eventuellement, la dispersion aqueuse plastifiée d'éthylcellulose était mélangée avec la dispersion aqueuse plastifiée de poly(vinyle acétate) 30 min avant l'enrobage (sous agitation magnétique). Les ratios des mélanges indiqués font référence aux masses de polymères (w:w). Tous les niveaux d'enrobage font référence au poids respectif des couches de SA et de polymère par rapport au poids de la minigranule (juste avant l'application de la couche en question). Après l'application de la dernière couche les minigranules étaient séchées et durcies dans un four à 60 °C pendant 24 h.

3) Les études de libération de la substance active

La libération de la SA à partir de la minigranule était mesurée dans un appareil à pâles (USP 39 ; Sotax, Basel, Suisse) (900 mL; 37 °C, 100 rpm, 1 g de minigranules par récipient de dissolution; n=3) dans une solution de HCl à 0.1 M pendant les deux premières heures, suivies par du tampon phosphate à pH 7.4 (USP 39) pendant les six heures suivantes (changement total du milieu). A des temps prédéterminés, 3 mL d'échantillon étaient prélevés et analysés en spectrophotométrie UV-Visible ($\lambda = 274$ nm pour le métoprolol, $\lambda = 289$ nm pour le propranolol; Anthelie Advanced, Secomam, Domont, France).

III. Résultats et discussion

1) Une couche unique de polymère

La Figure 1 montre la libération du métoprolol à partir de minigranules enrobées d'une couche unique de chaque polymère : éthylcellulose ou poly(vinyle acétate). Le niveau d'enrobage de la couche de polymère était modulé de 2.5 to 7.5 %, comme indiqué sur les diagrammes. Le noyau de la minigranule était formé de sucre ou de CMC et la charge initiale de SA était de 5%. De toute évidence, un profil de libération en forme de courbe classique a été observée dans tous les cas : Aux temps précoces, la vitesse de libération était élevée puis diminuait progressivement pendant la période d'observation (la pente de la courbe diminuait régulièrement avec le temps). Ce type de profil de libération est conforme à l'hypothèse que la diffusion de la SA à travers les couches de polymère joue un rôle majeur dans la cinétique de

libération de SA: Lors du contact de la formulation avec le milieu, l'eau pénètre dans le système et dissout la SA. Etant donné que le succinate de métoprolol est très soluble dans l'eau et que la charge initiale de SA est relativement faible, nous pouvions nous attendre à ce que la SA soit rapidement dissoute. Une fois dissoute, la SA diffuse à travers le polymère d'enrobage vers le milieu de dissolution environnant. Cette dernière étape est souvent la plus lente dans la cascade des événements et peut être déterminante pour la vitesse globale de libération de la SA. Etant donné que les conditions *perfect sink* sont respectées tout au long de l'expérimentation, la force motrice pour la SA, qui est « le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la formulation », est plus élevée aux temps précoces du test de libération: La quantité totale initiale de SA est susceptible d'être dissoute rapidement à l'intérieur des minigranules, tandis que la concentration de SA à l'extérieur du système est négligeable. Ainsi, la vitesse de libération est élevée aux temps précoces. Avec le temps, de plus en plus de SA diffuse vers le milieu de dissolution environnant, ce qui tend à diminuer la concentration de la SA à l'intérieur des minigranules (les molécules ou ions de SA libérée ne sont pas remplacés) d'où une diminution de la force motrice pour la diffusion et donc une diminution de la vitesse de libération. En pratique, ce type de profil de libération n'est pas recherché car il conduit potentiellement à une concentration sub-optimale de la SA au niveau de son site d'action: Finalement, des concentrations toxiques de SA peuvent être atteintes initialement suivies par des concentrations sub-thérapeutiques (même si la libération de SA est toujours en cours mais trop lente). Il faut noter que la diffusion à travers l'enrobage se déroule à travers une couche de polymère intacte et/ou à travers de canaux/fissure remplis d'eau.

Lors de la comparaison des libérations de métoprolol à partir des minigranules composées de sucre et de CMC (côté gauche versus côté droit de la figure 1) nous observons que la libération tend à être plus rapide dans le cas des noyaux de CMC pour les enrobages d'éthylcellulose tandis que nous observons l'inverse avec les enrobages de poly(vinyle acétate). Ceci peut être expliqué par la chose suivante : les films d'éthylcellulose sont moins flexibles que ceux de poly(vinyle acétate) [29], [30]. Ainsi, le gonflement de la CMC peut expliquer la potentielle formation de fissures dans l'enrobage d'éthylcellulose du système. Une fois les fissures formées, la libération de la SA peut se produire à travers les canaux remplis d'eau, ce qui est généralement plus rapide que par diffusion à travers l'enrobage intact. Dans le cas de noyaux de sucre, nous pouvons nous attendre, à la vue de l'activité osmotique de cet excipient très hydrosoluble, à une prise d'eau du noyau plus importante que

celle des noyaux de CMC, créant ainsi un « contre courant » pour la diffusion de la SA en dehors du système, ce qui ralentirait d'abord la libération de la SA. De plus, la co-dissolution d'une grande quantité de sucre peut affecter la solubilité de la SA et/ou les propriétés mécaniques des films d'enrobage. Contrairement à l'éthylcellulose, le poly(vinyle acétate) est beaucoup plus flexible et peut éventuellement résister au gonflement (limité) des noyaux de CMC. Dans ce cas, pas ou peu de fissures se forment (ou leur formation est ralentie) comparé aux films d'éthylcellulose et la libération du métoprolol est ralentie. De plus, des quantités beaucoup plus faibles d'eau seraient capables d'être entraînées dans les minigranules composées de noyaux de MCC par rapport aux noyaux de sucre, ce qui conduit à un gonflement moins prononcé et à une probabilité réduite de la formation de fissures avec les enrobages de poly (vinyle acétate), expliquant l'observation d'une libération de SA plus lente

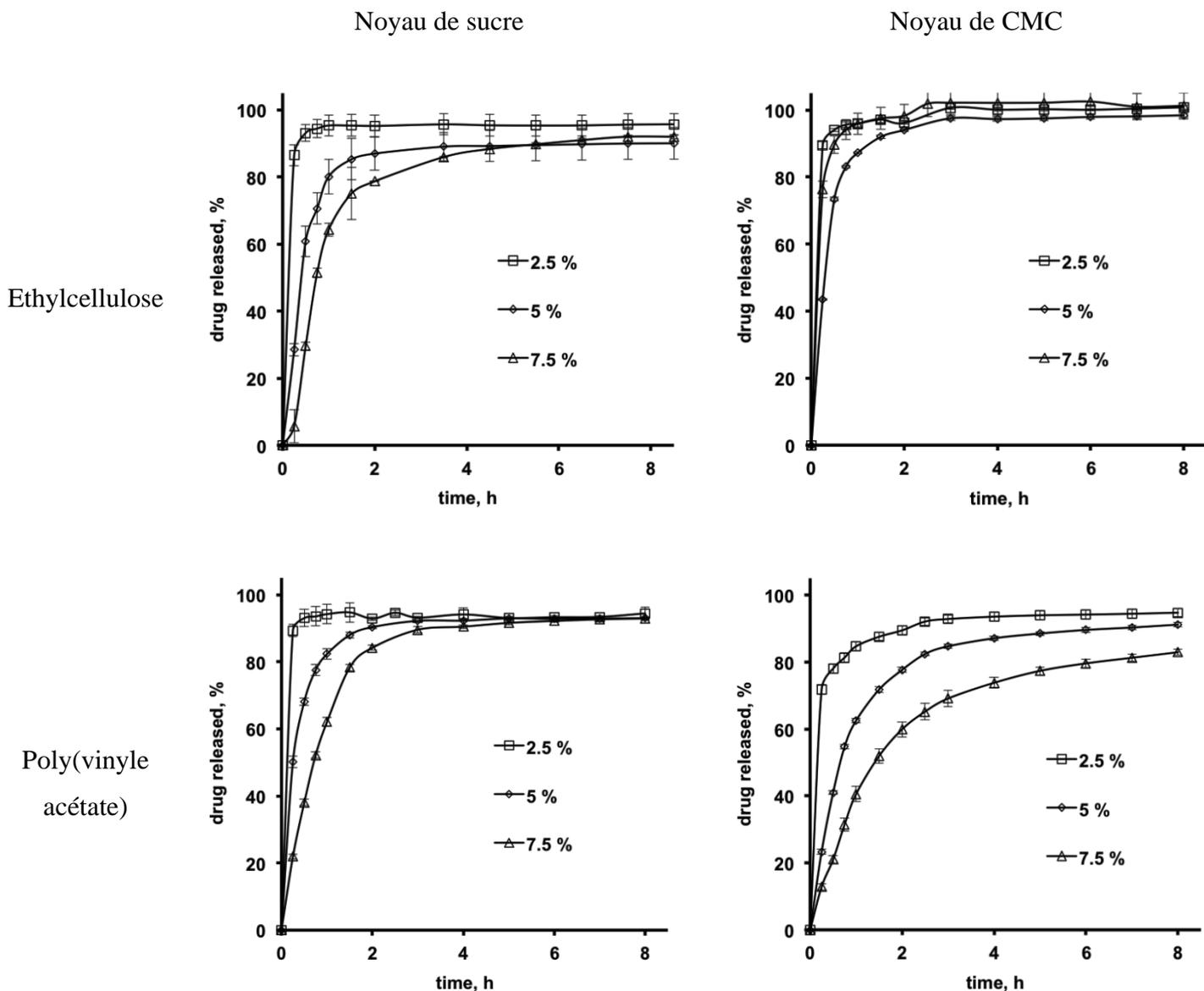


Figure 1: La libération de métoprolol à partir des minigranules enrobées d'éthylcellulose (en haut) ou le poly (vinyle acétate) (en bas), composées de noyaux de sucre (à gauche) ou noyaux de CMC (à droite). Le niveau d'enrobage est indiqué sur les graphiques. La SA (5% charge initiale) a été directement pulvérisée sur les noyaux.

Une tentative pour fournir une vitesse de libération de la SA plus constante à partir de minigranules enrobées chargées avec le succinate de métoprolol fortement soluble dans l'eau avec une charge initiale de SA relativement faible a été d'utiliser des mélanges de polymères au lieu de polymères simples purs. Les enrobages composés de mélanges de polymères peuvent en effet fournir un grand potentiel pour la libération contrôlée de SA [31], [32]. La cinétique de libération de SA peut être très différente entre les systèmes enrobés avec un

mélange de deux polymères et les mêmes systèmes enrobés avec un simple polymère. Surtout, cela ne concerne pas seulement la pente des courbes de libération, mais aussi leur forme, car les mécanismes de libération sous-jacents peuvent être modifiés par le mélange de polymères [33], [34]. Dans cette étude, des mélanges 50:50 d'enrobage d'éthylcellulose et de poly(vinyle acétate) ont été étudiés (w:w, basé sur la masse de polymère). La cinétique de libération à partir des minigranules composées de noyaux de sucre et de CMC est illustrée dans la Figure 2. La charge initiale de SA était encore de 5 %. Le niveau d'enrobage variait de 2.5 to 7.5 %, comme indiqué sur le graphique. Clairement, la libération de SA était très rapide dans tous les cas et généralement plus rapide que pour les minigranules enrobées de polymères purs (Figure 2 versus Figure 1). Cela indique sans doute qu'aucun revêtement de polymère dense a été formé dans ces conditions, ce qui pourrait éventuellement être attribué à la coalescence non-parfaite des particules de polymères (des dispersions aqueuses de polymères ont été utilisés). Ainsi, ce type de mélange de polymères ne semble pas être prometteur pour obtenir une vitesse de libération de la SA d'ordre zéro pour le type de SA et de noyaux utilisés dans l'étude.

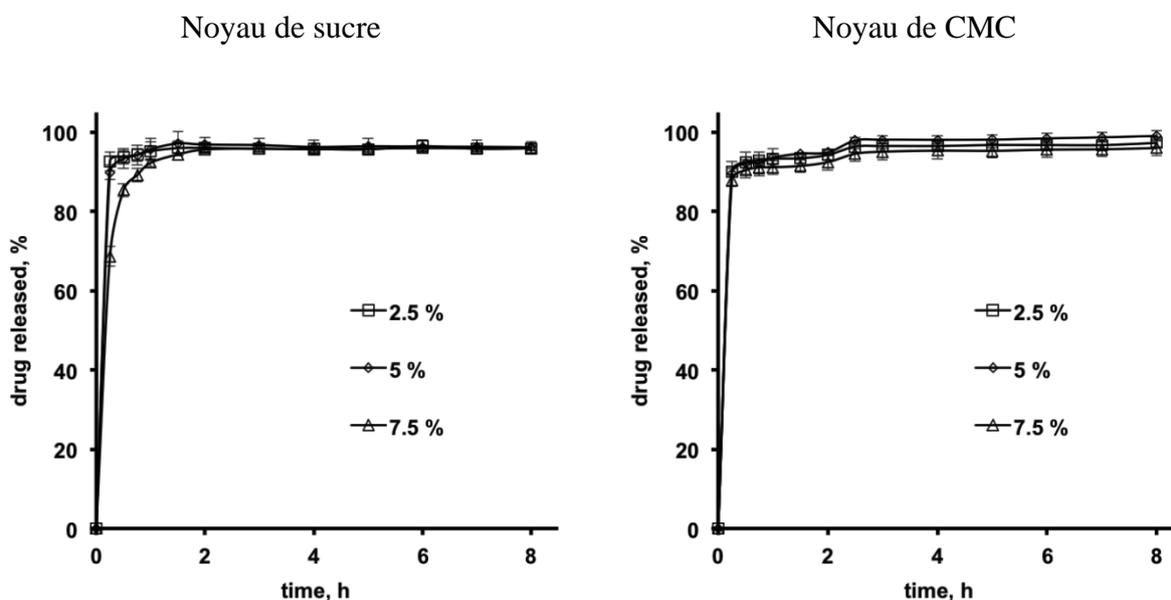


Figure 2: La libération de la SA à partir de minigranules enrobées avec un mélange 50:50 de dispersions aqueuses d'éthylcellulose et de poly (vinyle acétate). Le type de noyau est indiqué en haut et le niveau d'enrobage dans les diagrammes. La substance active (5% de charge initiale) a été directement pulvérisée sur les noyaux.

2) Alternance de couches de polymère

La tentative suivante pour obtenir une libération de SA, fortement hydrosoluble comme le succinate de métoprolol, d'ordre zéro à partir de minigranules enrobées, était

d'enrober les systèmes composés de noyau de sucre et chargé en SA d'une alternance de couches de deux polymères : éthylcellulose and poly(vinyle acétate). Nous pouvons nous attendre à ce que la structure interne des enrobages puisse être très différente de la structure interne des enrobages composés d'un mélange 50 :50 des différents polymères décrits auparavant dans l'étude, différents types de cinétique de libération peuvent en résulter. La combinaison des deux polymères (présentant différentes propriétés physico-chimiques) dans les couches successives pourrait permettre, à terme, à la SA de s'accumuler différemment dans ces couches et / ou de traverser ces couches différemment perméables. Par exemple, un type de couche (présentant une plus grande affinité pour le médicament que l'autre) pourrait éventuellement agir comme une sorte de « réservoir » de SA et/ou un type de couche pourrait plus facilement montrer la formation de fissures qu'une autre et/ou une perméabilité différente à travers le réseau macromoléculaire, ce qui entraînerait l'apparition de différents obstacles pour la libération de la SA et un profil de concentration de médicament non-homogène dans l'enrobage (selon la répartition et les coefficients de diffusion respectifs). Si la diffusion du métoprolol joue un rôle majeur dans le contrôle de la libération, de tels changements dans les gradients de concentration de la SA pourraient conduire à des modifications des profils de libération. La Figure 3 montre la vitesse de libération du métoprolol mesurée expérimentalement à partir de minigranules composées de noyaux de sucre et de CMC, enrobées de SA (5 % de charge initiale) et de 2, 3 ou 4 couches séquentielles d'éthylcellulose et de poly(vinyle acétate), comme indiqué. Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2.5 %. Les symboles vides et les courbes en pointillés représentent les systèmes pour lesquels la couche la plus interne d'enrobage est une couche de poly(vinyle acétate), tandis que les symboles pleins et les courbes pleines correspondent aux minigranules pour lesquelles la couche la plus interne d'enrobage est une couche d'éthylcellulose. Comme nous pouvons le constater, le succès de cette stratégie à fournir une libération d'ordre zéro a seulement été limité pour tous les cas observés: le profil de libération reste clairement sous une forme de « courbe ». Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec un système composé de quatre couches de polymère, débutant par une couche interne d'éthylcellulose et un noyau de départ composé du sucre. La vitesse de libération de la SA était encore loin d'être constante dans le temps dans ce cas.

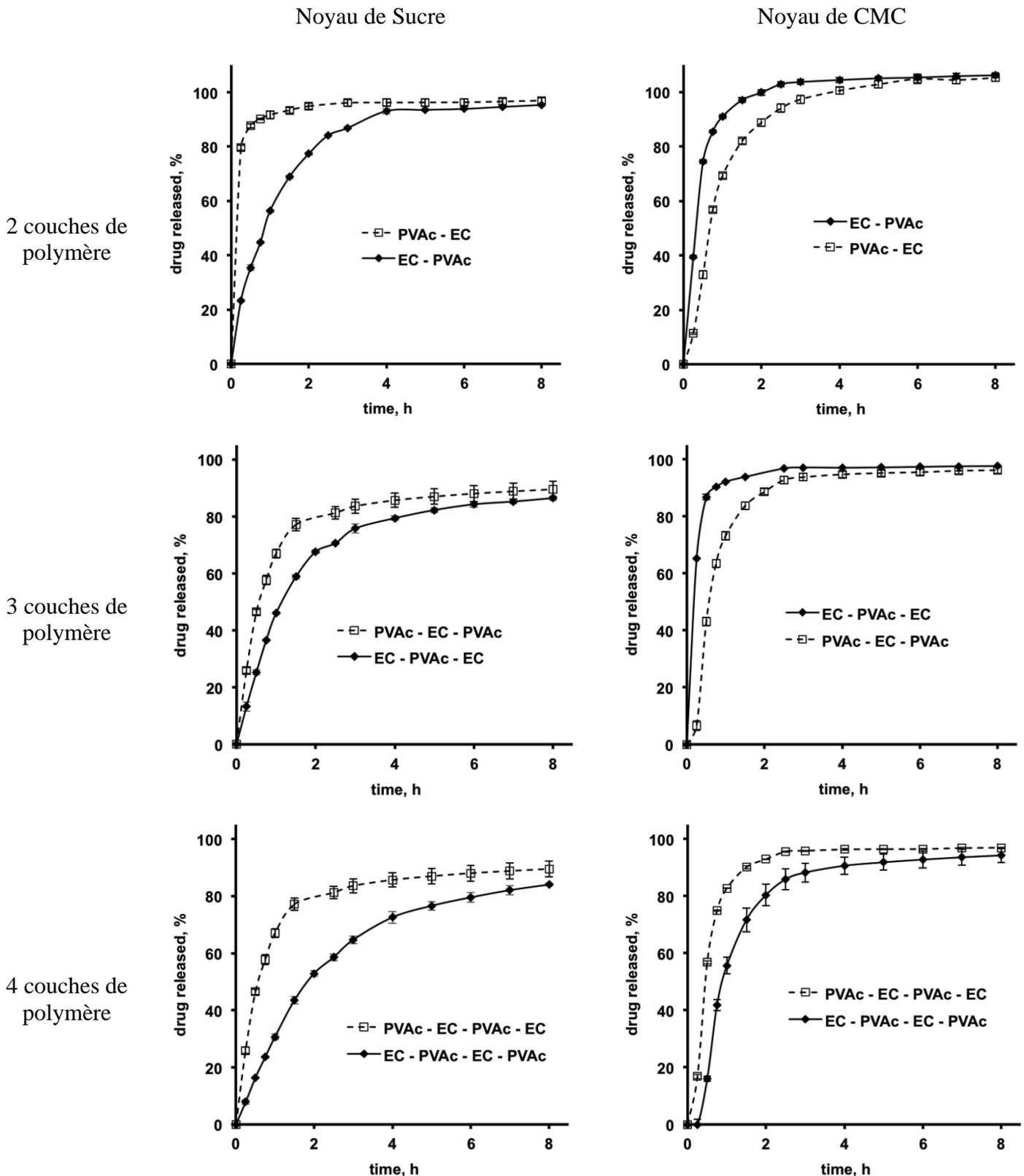


Figure 3: La libération de métoprolol à partir de minigranules enrobées de 2, 3 ou 4 couches de polymères, comme indiqué sur le côté gauche. La composition et la séquence des couches polymères sont précisées sur les graphiques [EC = éthylcellulose; PVAc = poly (vinyle acétate)]. Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2,5%. Le type de noyau est indiqué en haut. La substance active (5% charge initiale) a été directement pulvérisée sur les noyaux

Généralement, la vitesse de libération diminue avec l'augmentation du nombre de couches d'enrobage de polymères, à cause de l'augmentation de l'épaisseur entière de la barrière à franchir. La libération est toujours plus lente à partir de minigranules dont la couche d'enrobage la plus interne est une couche d'éthylcellulose lorsque nous utilisons des noyaux de sucre. Cela peut éventuellement être expliqué par l'effet protecteur d'une telle couche d'éthylcellulose interne. La perméabilité à l'eau de ce polymère est faible, limitant la pénétration de l'eau par osmose dans les systèmes en raison de la présence des noyaux de sucre [35]. Au contraire, dans le cas de noyau de CMC, la libération de la SA était uniquement plus lente à partir d'un système enrobé de 4 couches d'enrobage dont la couche interne était une couche d'éthylcellulose. Dans le cas de 2 et 3 couches d'enrobage, les systèmes composés d'une couche la plus interne de poly(vinyle acétate) ont montré une libération plus lente que ceux composés d'une couche interne d'éthylcellulose. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que dans le cas de noyaux de CMC, le gonflement entraîne la formation rapide de fissures dans la couche d'éthylcellulose la plus interne, tandis que la présence d'une couche intermédiaire flexible de poly(vinyle acétate) peut en quelque sorte jouer le rôle de couche d'amortissement et de retard à la formation de fissure. Etant donné que les minigranules composées de noyau de sucre, de 4 couches de polymères avec une couche d'éthylcellulose comme couche interne, ont montré les résultats de cinétique les plus prometteurs, ce type de système a été optimisé en augmentant le nombre de couches de polymère : la Figure 4 montre la libération de SA à partir de minigranules composées de noyau de sucre enrobées de 5 % de succinate de métoprolol puis d'une succession de couche d'éthylcellulose, poly(vinyle acétate), éthylcellulose et ainsi de suite. Le nombre de couches de polymère a varié de 4 à 10, le niveau d'enrobage de chaque couche était 2,5 et 2%, comme indiqué. Comme nous pouvons le constater, le degré de courbure des profils de libération diminue de plus en plus avec le nombre de couches dans les deux cas. Cependant, même les minigranules enrobées de 10 couches ne montrent pas de libération d'ordre zero. Ainsi, cette approche semble être insuffisante.

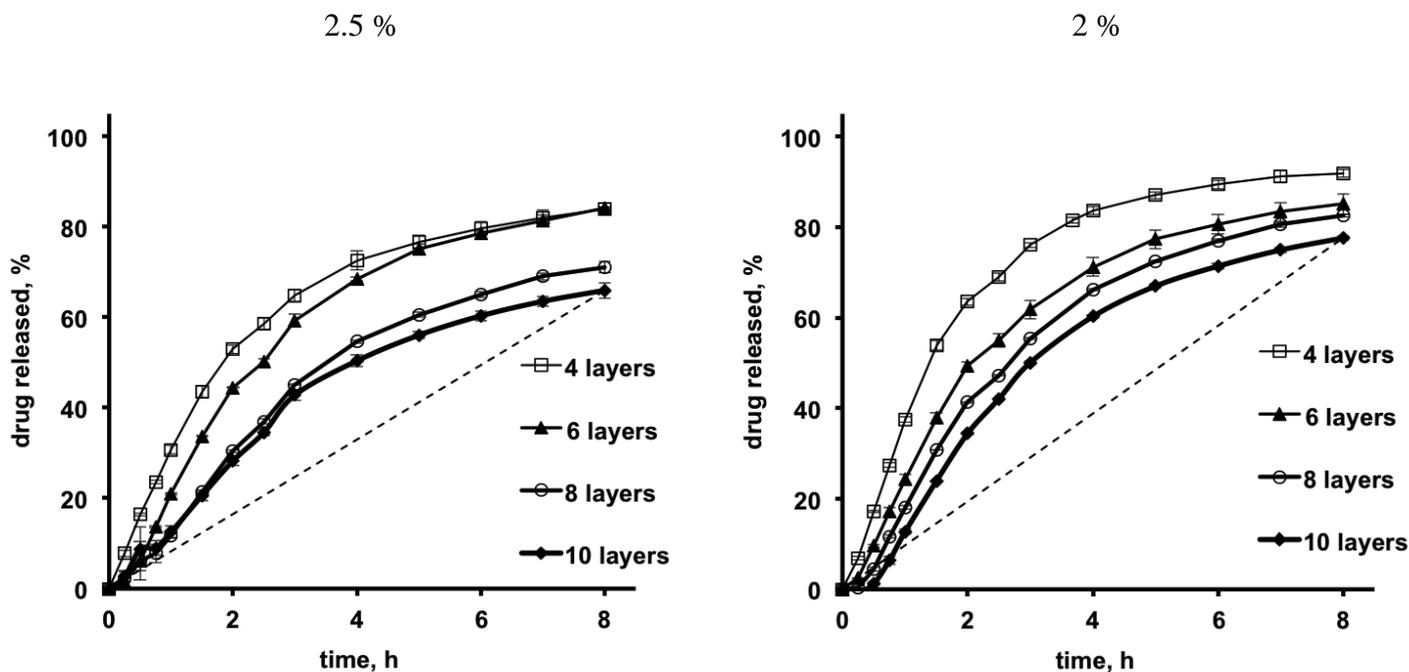


Figure 4: Impact du nombre de couches de polymères (indiqué sur les diagrammes) sur libération du métoprolol à partir de minigranules composées de noyaux de sucre. Les noyaux ont été enrobés de substance active, puis de couche d'éthylcellulose et PVAc alternatif. Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2,5% (gauche), et de 2% (droite). La SA (5% charge initiale) a été directement pulvérisée sur les noyaux. Les droites pointillées visent à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération des formulations les plus prometteuses par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

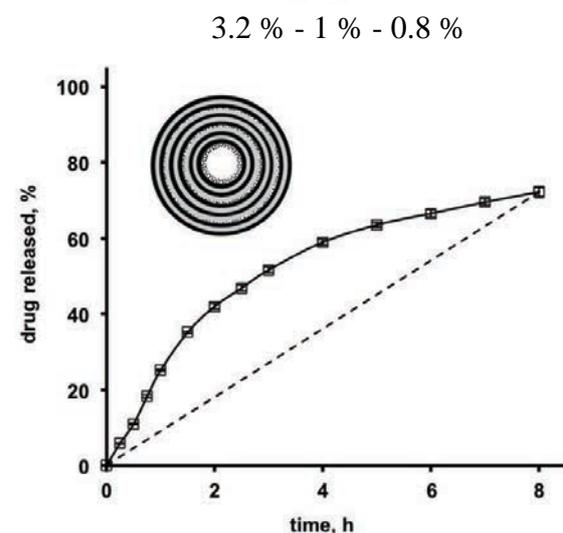
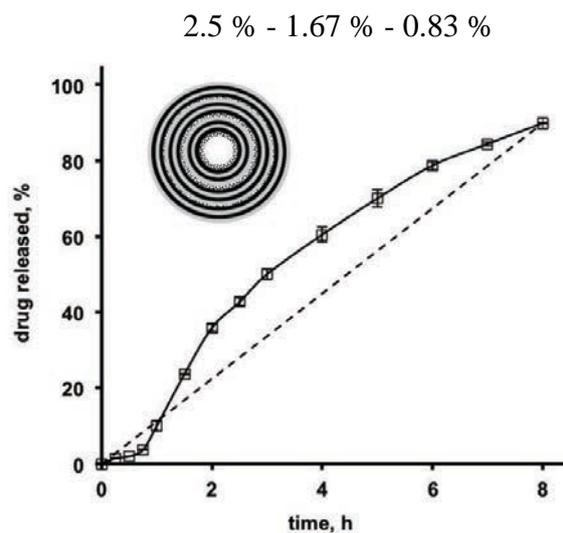
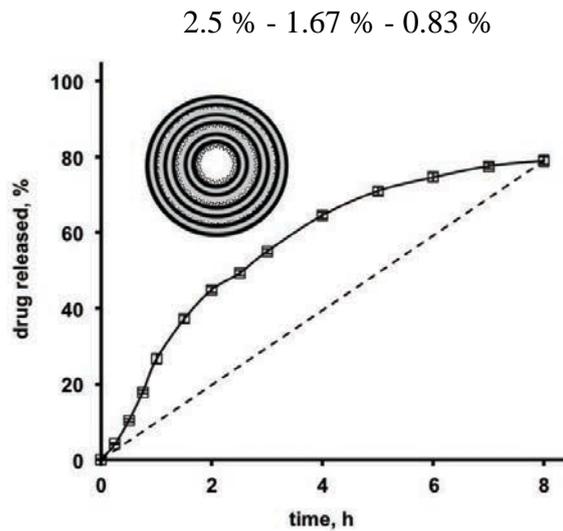


Figure 5: La libération de la SA à partir de minigranules composées de noyaux de sucre (en blanc), enrobées de deux couches de SA (points noirs) et de multiples couches d'enrobage d'éthylcellulose (noir) et PVAc (gris). Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2,5%, les niveaux d'enrobage des deux couches médicamenteuses (de l'intérieur vers l'extérieur) sont indiqués en haut de chaque diagramme. Pour des raisons de visibilité, la taille du noyau et l'épaisseur des couches des systèmes ne sont pas à l'échelle. Les droites pointillées visent à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération des formulations les plus prometteuses par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

3) Alternance de couches de substance active et de couches de polymère

La dernière stratégie expérimentée pour obtenir une libération de la SA la plus constante possible, à partir de minigranules a été de diviser la dose totale de SA dans deux ou plusieurs couches, séparées par des couches de polymères initialement dépourvues de SA. L'idée de base est que l'augmentation de la longueur des voies de diffusion au cours du temps pourrait éventuellement être compensée par une augmentation du gradient de concentration: La(les) couche(s) la(les) plus interne(s) de SA étant plus chargée(s) que la(les) couche(s) externe(s). De plus, des effets de temps de latence et de diffusion initiale partielle de la SA vers le noyau de la minigranule peuvent contribuer à obtenir une libération plus constante : une fois la couche de SA dissoute, elle diffuse vers les couches internes voisines et les couches externes voisines de polymères (initialement dépourvue de SA). Ceci parce que des gradients de concentration existent d'abord dans les deux directions: vers la surface de la minigranule et vers le noyau de celle-ci. La figure 5 montre la cinétique de libération expérimentalement mesurée à partir de minigranules composées de noyau de sucre, enrobés d'une première couche de SA contenant 2.5 ou 3.2 % de SA , puis d'une couche d'éthylcellulose, de poly(vinyle acétate), d'éthylcellulose et de poly(vinyle acétate), suivi d'une seconde couche de SA contenant 1.67 ou 1 % de SA, suivi d'une couche d'éthylcellulose, de poly(vinyle acétate), d'éthylcellulose et de poly(vinyle acétate). Les schémas dans les diagrammes illustrent schématiquement les différentes couches [noyaux de sucre = blanc, SA = points noirs, éthylcellulose = noir, poly (vinyle acétate) = gris]. Nous pouvons noter que la taille du noyau et l'épaisseur des couches ne sont pas à l'échelle, pour des raisons de visibilité. Le niveau d'enrobage de chacune des couches de polymère était de 2.5 %. En comparant les diagrammes de gauche et de droite de la figure 5, nous pouvons observer que le principe général de donner une charge plus importante en SA aux couches de SA les plus internes et de diminuer cette charge dans les couches de SA plus éloignées se traduit en quelque sorte par une vitesse de libération de la SA moins variable au cours du temps. Cependant, la libération de la SA n'atteint toujours pas une libération d'ordre zéro. C'est pourquoi le nombre de couches de SA a encore été augmenté : les figures 6 et 7 illustrent la libération de métoprolol à partir de minigranules contenant 3 ou 4 couches de SA respectivement. Les charges des différentes couches de succinate de métoprolol sont indiquées au dessus de chaque graphique (de l'intérieur vers l'extérieur du système). Le schéma de chaque graphique illustre la séquence des différentes couches de polymères dans ce même système. La différence entre les minigranules représentée en haut et celles du milieu de la figure 6 est la présence d'une couche externe supplémentaire de poly(vinyle acétate)

pour le graphique du centre. Comme on peut le voir, la vitesse de libération de la SA n'était toujours pas d'ordre zéro, en dépit de la complexité des systèmes contenant de multiples couches de SA et de polymères. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec un système de 3 couches de SA et de 12 couches de polymères, présentant un certain temps de latence durant la première heure (diagramme du milieu sur la figure 6).

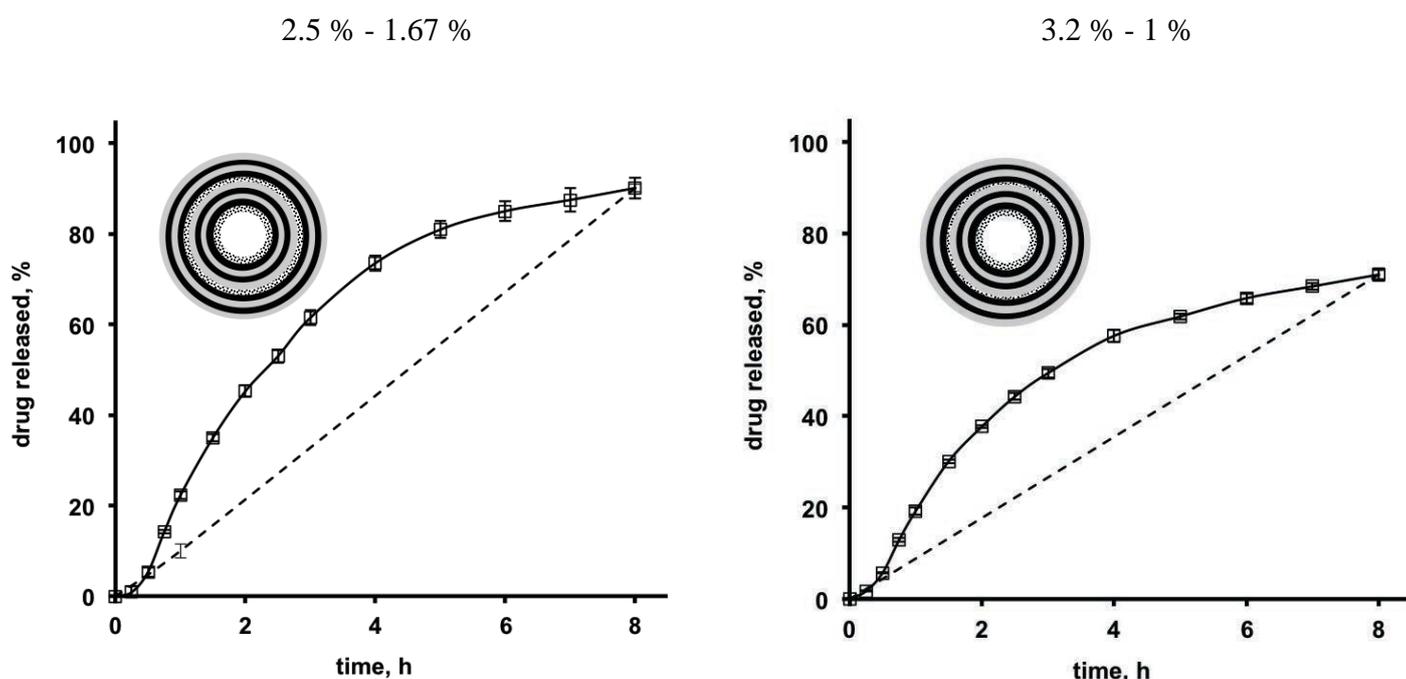


Figure 6: La libération de SA à partir de minigranules composées de noyaux de sucre (blanc), de trois couches de SA (points noirs) et de multiples couches d'enrobage d'éthylcellulose (noir) et PVAc (gris). Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2,5%, les niveaux d'enrobage des trois couches médicamenteuses (l'intérieur vers l'extérieur) sont indiqués en haut de chaque diagramme. Pour des raisons de visibilité, la taille du noyau et l'épaisseur des couches des systèmes ne sont pas à l'échelle. La différence entre les minigranules du diagramme du haut et celui du centre est la présence d'une couche extérieure supplémentaire de PVAc dans le diagramme du milieu. La droite pointillée vise à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération de la formulation par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

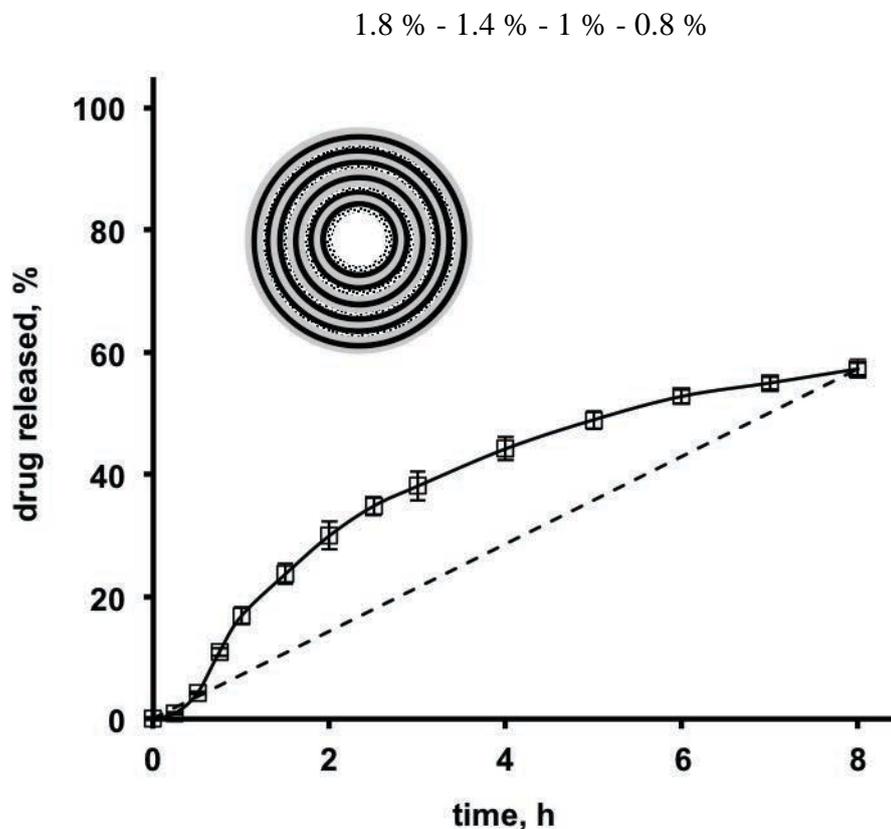


Figure 7: La libération de la SA à partir de minigranules composées de noyaux de sucre (blanc), de 4 couches de SA (points noirs et de multiples couches d'enrobage d'éthylcellulose (noir) et PVAc (gris)). Le niveau d'enrobage de chaque couche de polymère était de 2%, les niveaux d'enrobage des 4 couches médicamenteuses (l'intérieur vers l'extérieur) sont indiqués en haut de chaque diagramme. Pour des raisons de visibilité, la taille du noyau et l'épaisseur des couches des systèmes ne sont pas à l'échelle. La droite pointillée vise à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération de la formulation par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

Pour simplifier la structure d'enrobage, seul un type de polymère a été utilisé pour la suite et le nombre de couche de SA a été réduit à 2 couches. Dans ce cas, une vitesse de libération intéressante et plutôt constante pourrait être obtenue: la figure 8 montre la libération de métoprolol à partir de minigranules composées de noyaux de sucre et enrobées d'une couche de SA à 3%, d'une couche de poly(vinyle acétate) à 7,5%, d'une couche de SA à 2% et d'une couche de poly(vinyle acétate) à 7,5%. En regardant de près la courbe, on peut voir

que la phase initiale de libération de médicament (au cours des 2-3 première heures) semble être partiellement affectée par des effets temps de latence. Ainsi, la stratégie générale visant à diviser la dose totale de substance active en différentes couches avec des charges plus élevées au centre, près du noyau et étant séparées par des couches de polymère initialement dépourvues de SA, semble être adaptée pour obtenir une libération à peu près constante de SA fortement soluble dans l'eau à partir de minigranules enrobées. Enfin, les enrobages peuvent consister simplement en deux couches de SA et deux couches de polymère (en utilisant simplement une préparation d'enrobage de SA et une préparation d'enrobage de polymère à pulvériser).

3 % - 2 %

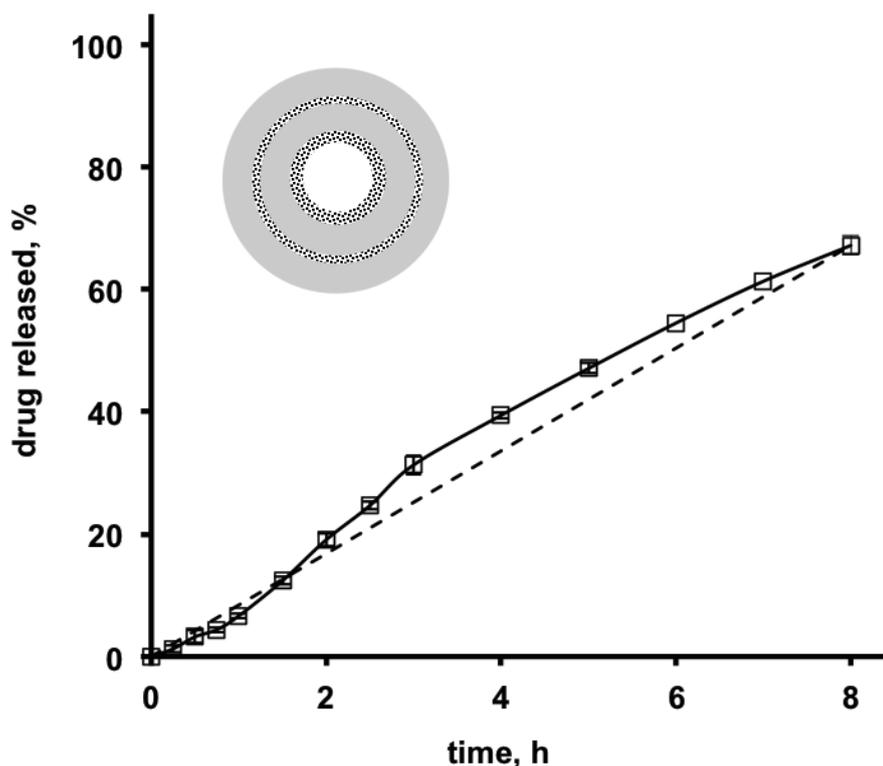


Figure 8: La libération de métoprolol à partir de minigranules composées de noyaux de sucre (blanc), deux couches de SA (points noirs) et deux couches de PVAC (gris). Le niveau d'enrobage des couches de polymère était de 7,5%, le niveau d'enrobage des deux couches de SA (de l'intérieur vers l'extérieur) sont indiquées en haut du diagramme. Pour des raisons de visibilité, la taille du noyau et l'épaisseur des couches des systèmes ne sont pas à l'échelle. La droite pointillée vise à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération de la formulation par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

Pour évaluer l'applicabilité de la stratégie proposée pour fournir une libération de SA presque constante à partir de minigranules enrobées chargées avec de faibles quantités d'une SA fortement soluble dans l'eau, la même formulation (que celle représentée sur la figure 8) a été préparée, en remplaçant le succinate de métoprolol par le chlorhydrate de propranolol. Comme on peut le voir sur la figure 9, une libération de la SA relativement constante a été observée également dans ce cas. Ainsi, l'approche de la formulation présentée est transférable à d'autres types de SA. Notons que le fin réglage des compositions et épaisseurs des couches respectives d'enrobage élaboré au cas par cas permettrait une optimisation plus poussée de libération de la substance active.

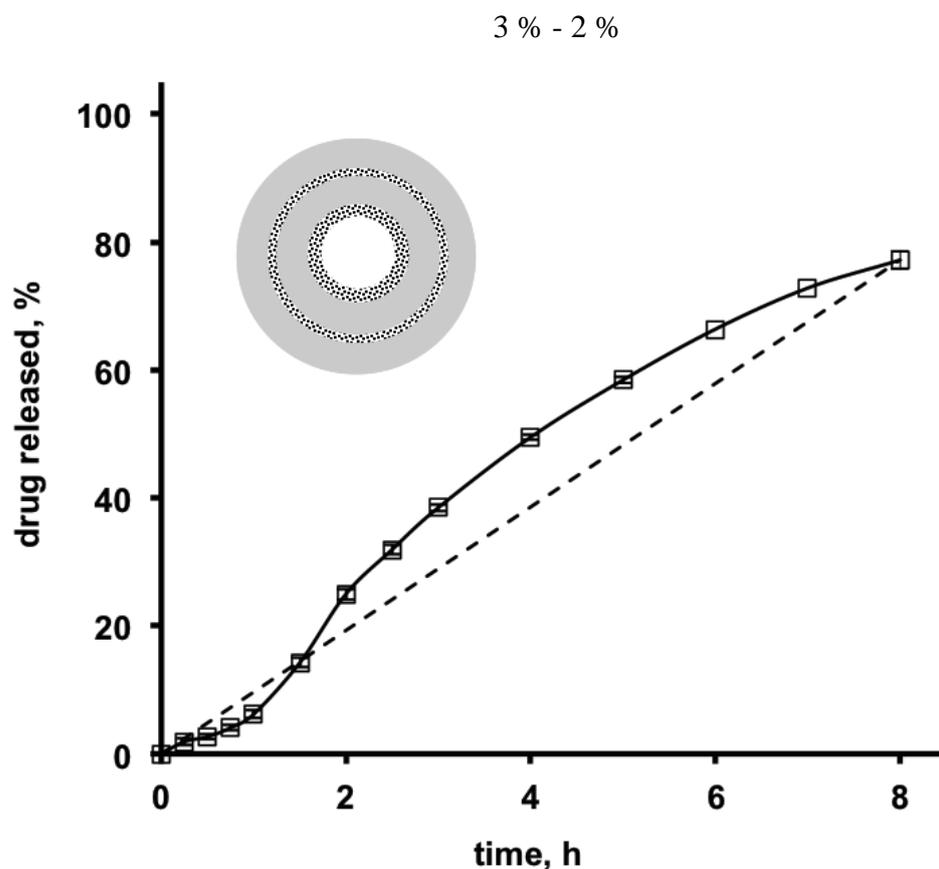


Figure 9: La libération de propranolol à partir de minigranules composées de noyaux de sucre (blanc), deux couches de SA (points noirs) et deux couches de PVAC (gris). Le niveau d'enrobage des couches de polymère était de 7,5%, le niveau d'enrobage des deux couches de SA (de l'intérieur vers l'extérieur) sont indiquées en haut du diagramme. Pour des raisons de visibilité, la taille du noyau et l'épaisseur des couches des systèmes ne sont pas à l'échelle. La droite pointillée vise à aider à visualiser l'écart entre la cinétique de libération de la formulation par rapport à la cinétique d'ordre zéro.

IV. Conclusions

Pour obtenir des vitesses de libération de substances actives, fortement solubles dans l'eau, relativement constantes (même à faibles charges initiales) à partir de minigranules enrobées, la dose de SA peut être divisée en différentes couches, séparées par des couches de polymère initialement dépourvues de SA. Une diminution de la vitesse de libération de la SA avec le temps est due à l'allongement des chemins de diffusion qui peut être compensé en chargeant avec une plus grande quantité de SA, la couche la plus proche du noyau de la minigranule, ce qui entraîne une augmentation du gradient de concentration avec le milieu environnant. De plus, des effets de latence et de diffusion initiale partielle vers le noyau de la minigranule sont susceptibles de contribuer à l'obtention d'un profil de libération d'ordre zéro. De manière importante, un système relativement simple : 2 couches de SA et 2 couches de polymère, avec un niveau d'enrobage total de seulement 20%, permet d'obtenir que libération constante de SA très hydrosoluble comme le succinate de métoprolol. Etant donné que les équipements et les conditions d'enrobage standards peuvent être utilisés, la transposition à l'échelle industrielle peut être réalisée de façon similaire à celle des minigranules à libération contrôlée enrobées classiques.

V. References

- [1] J. Siepmann, R. Bodmeier, et J. W. McGinity, « Progress in film coating », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 361, déc. 2013.
- [2] K. Kolter, A. Dashevsky, M. Irfan, et R. Bodmeier, « Polyvinyl acetate-based film coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 470-479, déc. 2013.
- [3] D. Sauer, M. Cerea, J. DiNunzio, et J. McGinity, « Dry powder coating of pharmaceuticals: A review », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 488-502, déc. 2013.
- [4] J. Siepmann et F. Siepmann, « Stability of aqueous polymeric controlled release film coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 437-445, déc. 2013.
- [5] M. Haaser, K. Naelapää, K. C. Gordon, M. Pepper, J. Rantanen, C. J. Strachan, P. F. Taday, J. A. Zeitler, et T. Rades, « Evaluating the effect of coating equipment on tablet film quality using terahertz pulsed imaging », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no 3, Part B, p. 1095-1102, nov. 2013.
- [6] A. Maroni, L. Zema, G. Loreti, L. Palugan, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral pulsatile release », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 362-371, déc. 2013.
- [7] A. Maroni, M. D. Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral colon delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 372-394, déc. 2013.
- [8] J. Siepmann et F. Siepmann, « Mathematical modeling of drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no 2, p. 328-343, déc. 2008.
- [9] J. Siepmann et F. Siepmann, « Modeling of diffusion controlled drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 161, no 2, p. 351-362, juill. 2012.
- [10] P. I. Lee, « Novel approach to zero-order drug delivery via immobilized nonuniform drug distribution in glassy hydrogels », *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no 10, p. 1344-1347, oct. 1984.
- [11] P. I. Lee, « Effect of non-uniform initial drug concentration distribution on the kinetics of drug release from glassy hydrogel matrices », *Polymer*, vol. 25, no 7, p. 973-978, juill. 1984.
- [12] P. I. Lee, « Initial concentration distribution as a mechanism for regulating drug release from diffusion controlled and surface erosion controlled matrix systems », *J. Controlled Release*, vol. 4, no 1, p. 1-7, juin 1986.
- [13] N. James Chang et K. J. Himmelstein, « Dissolution-diffusion controlled constant-rate release from heterogeneously loaded drug-containing materials », *J. Controlled Release*, vol. 12, no 3, p. 201-212, mai 1990.
- [14] M. P. Danckwerts, « Development of a zero-order release oral compressed tablet with potential for commercial tableting production », *Int. J. Pharm.*, vol. 112, no 1, p. 37-45, nov. 1994.

- [15] P. Hildgen et J. N. McMullen, « A new gradient matrix: Formulation and characterization », *J. Controlled Release*, vol. 34, no 3, p. 263-271, juin 1995.
- [16] U. Conte, L. Maggi, P. Colombo, et A. La Manna, « Multi-layered hydrophilic matrices as constant release devices (GeomatrixTM Systems) », *J. Controlled Release*, vol. 26, no 1, p. 39-47, juill. 1993.
- [17] D. Hariharan, N. A. Peppas, R. Bettini, et P. Colombo, « Mathematical analysis of drug delivery from swellable systems with partial physical restrictions or impermeable coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 112, no 1, p. 47-54, nov. 1994.
- [18] Y. Qiu, N. Chidambaram, et K. Flood, « Design and evaluation of layered diffusional matrices for zero-order sustained-release », *J. Controlled Release*, vol. 51, no 2-3, p. 123-130, févr. 1998.
- [19] N. Chidambaram, W. Porter, K. Flood, et Y. Qiu, « Formulation and characterization of new layered diffusional matrices for zero-order sustained release », *J. Controlled Release*, vol. 52, no 1-2, p. 149-158, mars 1998.
- [20] V. Malaterre, J. Ogorka, N. Loggia, et R. Gurny, « Oral osmotically driven systems: 30 years of development and clinical use », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 73, no 3, p. 311-323, nov. 2009.
- [21] D. S. T. Hsieh, W. D. Rhine, et R. Langer, « Zero-order controlled-release polymer matrices for micro- and macromolecules », *J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no 1, p. 17-22, janv. 1983.
- [22] B. Narasimhan et R. Langer, « Zero-order release of micro- and macromolecules from polymeric devices: the role of the burst effect », *J. Controlled Release*, vol. 47, no 1, p. 13-20, juill. 1997.
- [23] A. Y. Benkorah et J.-N. McMullen, « Biconcave coated, centrally perforated tablets for oral controlled drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 32, no 2, p. 155-160, déc. 1994.
- [24] C. Kim, « Compressed Donut-Shaped Tablets with Zero-Order Release Kinetics », *Pharm. Res.*, vol. 12, no 7, p. 1045-1048, juill. 1995.
- [25] D. C. Scott et R. G. Hollenbeck, « Design and Manufacture of a Zero-Order Sustained-Release Pellet Dosage Form Through Nonuniform Drug Distribution in a Diffusional Matrix », *Pharm. Res.*, vol. 8, no 2, p. 156-161, févr. 1991.
- [26] S. Strübing, H. Metz, F. Syrowatka, et K. Mäder, « Monitoring of dissolution induced changes in film coat composition by ¹H NMR spectroscopy and SEM », *J. Controlled Release*, vol. 119, no 2, p. 190-196, juin 2007.
- [27] S. Strübing, T. Abboud, R. V. Contri, H. Metz, et K. Mäder, « New insights on poly(vinyl acetate)-based coated floating tablets: Characterisation of hydration and CO₂ generation by benchtop MRI and its relation to drug release and floating strength », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no 2, p. 708-717, juin 2008.
- [28] F. Siepman, A. Hoffmann, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « How to adjust desired drug release patterns from ethylcellulose-coated dosage forms », *J. Controlled Release*, vol. 119, no 2, p. 182-189, juin 2007.

- [29] F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Polymer Blends Used for the Coating of Multiparticulates: Comparison of Aqueous and Organic Coating Techniques », *Pharm. Res.*, vol. 21, no 5, p. 882-890, mai 2004.
- [30] Y. Cuppok, S. Muschert, M. Marucci, J. Hjaertstam, F. Siepmann, A. Axelsson, et J. Siepmann, « Drug release mechanisms from Kollicoat SR:Eudragit NE coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 409, no 1-2, p. 30-37, mai 2011.
- [31] F. Siepmann, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Blends of aqueous polymer dispersions used for pellet coating: Importance of the particle size », *J. Controlled Release*, vol. 105, no 3, p. 226-239, juill. 2005.
- [32] F. Siepmann, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Polymer blends for controlled release coatings », *J. Controlled Release*, vol. 125, no 1, p. 1-15, janv. 2008.
- [33] F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Blends of enteric and GIT-insoluble polymers used for film coating: physicochemical characterization and drug release patterns », *J. Controlled Release*, vol. 89, no 3, p. 457-471, mai 2003.
- [34] F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « pH-Sensitive Polymer Blends Used as Coating Materials to Control Drug Release from Spherical Beads: Elucidation of the Underlying Mass Transport Mechanisms », *Pharm. Res.*, vol. 22, no 7, p. 1129-1141, juill. 2005.
- [35] S. Muschert, F. Siepmann, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepmann, « Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets », *J. Controlled Release*, vol. 135, no 1, p. 71-79, avr. 2009.

Conclusion intermédiaire

Malgré l'importance pratique d'élaborer des formes à libération prolongée de PA avec un procédé de fabrication simple, étonnamment, peu de stratégies efficaces sont connues. Dans cette étude, la nouvelle approche testée, basée sur une succession de couches de PA et de polymères (initialement dépourvu de PA) présentant une distribution initiale de PA non homogène, associé à un effet de temps de latence et à une diffusion partielle initiale à travers le noyau de la minigranule nous a permis d'optimiser une formulation candidate. Des modifications du type, de la quantité, de l'épaisseur et de la séquence des couches de PA et de polymères ont été testées et un système assez simple composé de quatre couches (deux couches de PA et deux couches de polymère) permettait d'aboutir à une libération relativement constante durant 8h.

Cette formulation optimisée ouvre les perspectives d'élaboration d'autres formulations à libération soutenue sur le même modèle. Ces nouvelles formes pourraient permettre la libération d'autres PA ou d'associer des PA sous forme de couches ou directement contenus au niveau du noyau de la formulation.

Le mécanisme de libération de ces formulations pourrait être étudié afin de définir les caractéristiques et l'ordre de succession optimal des polymères permettant d'obtenir une libération soutenue.

Conclusion générale

L'introduction de ce travail reprenait les principes et définitions des différentes formes galéniques permettant de contrôler la libération des principes actifs à administration orale. Parmi celles-ci, la libération colique et la libération contrôlée d'ordre zéro sont deux approches qui ont été développées dans ce travail. Pour atteindre une libération colique du principe actif, différentes stratégies peuvent être utilisées, bien que l'utilisation de systèmes enrobés de polymères sensibles aux enzymes bactériennes de la microflore colique semble être la plus spécifique et donc celle utilisée dans la seconde partie du manuscrit. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ont également été décrites dans cette partie car leur traitement représente, entre autres, l'enjeu clinique de la libération colique des principes actifs. Pour la libération contrôlée d'ordre zéro de PA, des formes galéniques existent mais la transposition de leur fabrication à l'échelle industrielle reste un obstacle à leur commercialisation. Ainsi, l'élaboration d'un système relativement simple permettrait de surmonter cette difficulté.

Le premier chapitre était consacré à l'élaboration d'un état des lieux des pratiques concernant les tests de libération des systèmes à libération colique de principes actifs utilisant dans leur composition des polysaccharides sensibles aux enzymes bactériennes de la microflore colique. Les méthodes utilisées et décrites dans la littérature sont nombreuses et diverses. L'utilisation de bactéries présentes dans le côlon ou les enzymes produites par ces bactéries semblent être essentielle pour simuler le compartiment colique et montrer une spécificité des formulations à libération colique. Les Pharmacopées ne décrivent aucune méthode standard. Cependant les pratiques d'homogénéisation permettraient de pouvoir comparer les résultats des tests de différentes formulations à libération colique et aideraient au développement de nouvelles formulations.

Le second chapitre consistait en la mise au point d'une formulation à libération colique d'acide 5-aminosalicylique pour le traitement des MICI. Les stratégies utilisées pour cibler la libération du médicament et les méthodes utilisées pour tester la libération de ces formes sont nombreuses et variées. Dans ce travail, une méthode de test de libération de PA à libération colique a été développée. Cette technique a prouvé sa reproductibilité et le caractère discriminant sur deux formulations testées. Elle présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques décrites dans la littérature, y compris l'utilisation de selles de patients

atteints de MICI qui se rapprochent le plus de la flore bactérienne des patients traités avec ces thérapies. Cette étude a permis d'identifier, parmi les amidons résistants, l'inuline. Ce polysaccharide d'enrobage présente, parmi les amidons testés, la meilleure libération du PA dans les conditions coliques, lorsqu'il est utilisé en solution comme enrobage associé à de l'éthylcellulose. La comparaison des résultats obtenus avec les selles des patients sous antibiothérapie ou non, a permis de montrer que ces formulations pouvaient être efficaces même en cas de co-administration d'antibiotiques, bien que ces traitements affectaient le taux de libération finale de PA. Enfin, l'étude de la croissance bactérienne pendant le test de libération était en faveur d'un effet prébiotique potentiel du polysaccharide dans les formulations testées. L'industrie pharmaceutique est incitée à développer de nouvelles formes pharmaceutiques, en accord avec les besoins des praticiens, avec des doses appropriées et des effets indésirables évités. Le développement de nouvelles options thérapeutiques pour le traitement MICI nécessite le développement de nouvelles formulations qui doivent être testées de manière reproductible et rapide. La standardisation de ces tests permettrait d'éviter les biais observés dans les différentes études décrites dans la littérature. La méthode utilisant les selles de patients atteints de MICI que nous avons utilisée dans cette étude semble être l'une des méthodes les plus réalistes qui permettent la normalisation. Cependant, l'optimisation d'un mélange bactérien standardisé pour se substituer aux échantillons de selles fraîches de patients serait un moyen plus rapide et moins contraignant de tester ces nouveaux traitements à libération ciblée.

Les polysaccharides candidats pour l'enrobage de formes orales solides à libération colique ainsi que les molécules actives à libérer au niveau du côlon sont nombreux. Les perspectives pour la création de nouvelles combinaisons de molécules thérapeutiques ou le développement de nouvelles formulations à base de polysaccharides sont réalisables relativement rapidement avec ce nouveau test de libération colique. Néanmoins les tests *in vivo* sont encore nécessaires pour prouver une corrélation avec les résultats *in vitro*, l'efficacité et l'innocuité de ces nouvelles formulations. Nos travaux offrent cette perspective de mettre en œuvre des études *in vivo* chez l'animal des formulations sélectionnées, enrobées de polysaccharides, pour montrer leur efficacité clinique. Ce type d'études a déjà été mené avec des minigranules enrobées d'un mélange de Nutriose® et d'éthylcellulose (116).

Le troisième chapitre traitait de l'optimisation d'une formulation galénique dont la préparation était relativement facile à transposer à l'échelle industrielle et dont la libération contrôlée est d'ordre zéro. Pour fournir des taux de libération relativement constants de PA

librement solubles dans l'eau (même à faible charge initiale) à partir de minigranules enrobées, une des stratégies étaient de diviser la dose de PA en différentes couches, séparées par des couches de polymères initialement dépourvues de PA. Les difficultés rencontrées telles que la diminution de la vitesse de libération avec le temps, due à l'augmentation des distances dans le schéma de diffusion, pouvaient être compensées en fournissant une plus grande charge de PA plus près du noyau de la minigranule, ce qui entraînait une augmentation de la différence de concentration avec le milieu environnant. De plus, un effet de latence en début de libération et la diffusion partielle du PA dans le noyau de la minigranule semblaient contribuer à l'obtention d'un résultat proche de la libération d'ordre zéro. Ainsi un système assez simple a été développé, composé de deux couches de PA et deux couche de polymères avec un niveau d'enrobage total de seulement 20% permettant la réalisation d'une libération constante du succinate de métoprolol librement soluble dans l'eau. Ainsi, du matériel et des conditions standards d'enrobage peuvent être utilisés, mise à l'échelle et permettent d'obtenir des minigranules enrobées à libération contrôlée.

Cette étude ouvre la perspective de tester l'influence du changement de nature du principe actif sur la vitesse de libération de celui-ci. Le travail pourrait également être poursuivi en essayant de placer directement le principe actif dans le noyau de la minigranule. L'explication du mécanisme de libération serait également intéressant à analyser.

Ainsi, des obstacles de conception galénique de formes solides à administration orale peuvent être surmontés. Ces 2 approches nous ont permis de traiter différentes difficultés de conception : d'un côté ont été abordés les problèmes d'homogénéisation des tests de libération du PA *in vitro* et d'un autre côté les problèmes de transposition de la fabrication à l'échelle industrielle. D'autres enjeux de conception existent tels que l'optimisation rapide et peu coûteuse de nouvelles formulations qui peuvent être surmontés par l'élaboration de plans d'expériences ou la modélisation mathématique de profil de dissolution ou encore le challenge de l'adaptation de la forme galénique à certaines populations de patients comme les médicaments à usage pédiatrique. La préparation du médicament qui a quitté le cadre artisanal de l'officine, est devenue industrielle et acquiert un haut degré de complexité et de sophistication. Les défis sont nombreux et les solutions sont de plus en plus perfectionnées et font appel à de nouvelles technologies.

Reference

- [1] Y. Karrout, L. Dubuquoy, C. Piveteau, F. Siepmann, E. Moussa, D. Wils, T. Beghyn, C. Neut, M.-P. Flament, L. Guerin-Deremaux, L. Dubreuil, B. Deprez, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « *In vivo* efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy », *J. Controlled Release*.

Résumés

I. Résumé en français

Les thérapeutiques individualisées et ciblées se développent actuellement, les formes galéniques évoluent donc en parallèle pour contrôler la libération des principes actifs (PA) et les conduire au plus proche des sites d'intérêts. Les formes orales solides représentent les formulations galéniques les plus utilisées, faciles d'emploi, indolores et réduisant le risque d'infection. Lors de leur conception, il est aussi possible de moduler la libération du PA.

Deux approches sont étudiées dans ce manuscrit, l'une correspond au ciblage de la libération d'un PA vers son site d'action thérapeutique qui est le colon, la seconde consiste à contrôler la libération du PA pour maintenir une concentration constante, minimiser les effets indésirables et les périodes de présence de concentrations sub-thérapeutiques au niveau du site d'action.

Première approche :

Les traitements des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) peuvent être significativement améliorées par une libération localisée du PA. Une des approches est l'utilisation d'enrobages composés de polysaccharides dégradés par les enzymes sécrétées par la microflore colique. Mais l'absence d'une méthode *in vitro* reproductible simulant les conditions physiologiques du colon et l'impact potentiel des traitements antibiotiques associées qui pourraient affecter la quantité et la qualité des bactéries présentes et des enzymes sécrétées est un obstacle à sa mise au point. L'objectif de l'étude était d'effectuer un screening de polysaccharides ayant un intérêt dans le développement de nouvelles formulations à libération colique. Après cette sélection, les libérations des formulations retenues ont été évaluées par une méthode utilisant des selles de patients atteints de MICI traités ou non par antibiothérapie. Enfin, l'utilisation de mélanges bactériens pour un éventuel remplacement de l'utilisation de selles fraîches a été évaluée.

Seconde approche :

Les formes orales enrobées présentent un grand potentiel pour la libération contrôlée de PA. Néanmoins, il est difficile d'obtenir une libération à vitesse constante avec ce type de formulation. Ceci est généralement dû au rôle prédominant du transport de masse par diffusion, ce qui entraîne, avec le temps, une diminution de la concentration en PA au cœur du système, donc une réduction du gradient de concentration qui est la force motrice de la libération du PA. Ce type de cinétique de libération peut être inapproprié pour un traitement

médicamenteux sûr et efficace. Malgré l'importance pratique de ce défi crucial de formulation, étonnamment, peu de stratégies efficaces sont connues. Dans cette étude, une nouvelle approche, basée sur une succession de couches de PA et de polymères (initialement dépourvu de PA) présentant une distribution initiale de PA non homogène, associé à un effet de temps de latence et à une diffusion partielle initiale à travers le noyau de la minigranule. Des variations de type, de quantité, d'épaisseur et de séquence des couches de PA et de polymères ont été testées. Un système assez simple composé de quatre couches (deux couches de PA et deux couches de polymère) permettait d'aboutir à une libération relativement constante durant 8h.

VII. Résumé en anglais

Individualized and targeted therapies are currently developed, therefore the dosage forms move in parallel to control the drug release and drive it nearest to interest sites. Solid oral dosage forms are the pharmaceutical formulations the most common, easy to use, painless and reducing the infectious risk. In these formulation designs, it is also possible to adjust the drug release.

Two approaches are discussed in this manuscript, the first one targets the drug release to the therapeutic site of action which is the colon, and the second one consists on controlling the drug release to maintain a constant concentration, minimize side effects and periods of presence of sub-therapeutic concentrations at the site of action.

The first approach:

The treatment of colonic disease like Inflammatory Bowel Diseases (IBD), can be significantly improved via local drug delivery. One approach is to use polysaccharide coatings, which are degraded by enzymes secreted by the colonic microflora. However, the lack of a reliable *in vitro* test simulating conditions in a living colon and the potential impact of associated antibiotic treatments that could affect the quality and quantity of bacteria and enzymes secreted is an obstacle to its development. The aim of the study was to perform a screening of polysaccharides suitable for the development of new colonic release formulations. After this selection, the drug release of selected formulations were evaluated by a method using the stools of IBD patients treated or not with antibiotics. Finally, the use of bacterial mixtures substituting fresh fecal samples has been evaluated.

The second approach:

Coated pellets offer a great potential for controlling drug delivery systems. However, constant drug release rates are difficult to achieve with this type of dosage forms if the drug is freely water-soluble. This is because diffusional mass transport generally plays a major role and with time the drug concentration within the system decreases, resulting in decreased concentration gradients, which are the driving forces for drug release. This type of release kinetics might be inappropriate for an efficient and safe drug treatment. Despite the great practical importance of this potentially crucial formulation challenge, surprisingly little is yet known about efficient formulations. In this study, a novel approach is presented based on

sequential layers of drug and polymer (initially free of drug) to provide a non-homogeneous initial drug distribution, combined with lag-time effects and partial initial drug diffusion towards the pellet's core. By changing the type, number, thickness and sequence of the drug and polymer layers, a rather simple 4 layers system (2 drug and 2 polymer layers) allowed an about constant drug release during 8 h.

Annexe 1:

Critical review of drug release test methods for colon targeted bacterially degradable solid formulations

I. Introduction

Treatment of colonic diseases is difficult because drug concentration remains often low considering the drug being released in the upper gastrointestinal tract (and entering the blood circulation with drug levels in healthy tissues and leading to undesired side effects). It can be improved by increasing drug concentration at the target site (colon targeting). Colonic drug release is advantageous for chronotherapies or peptidic drug absorption. This colonic release requires:

- Resistance to gastric acidity,
- Resistance in the upper intestinal environment,
- Followed by a drug release during local degradation of the device.

Many strategies exploiting various physiological parameters of the gastrointestinal tract have been proposed to target the drug release in the colonic part of the gut [1], [2]. Studies were performed using delivery systems based on the use of polymers sensitive to pH changes [3], [4], on forms with time-dependent release [5], [6], on prodrugs [7], [8], on bacterially degradable polymer coatings or bacterially degradable matrix and hydrogel systems [9]–[13], or on combinations of different strategies [14], [15]. The transit time and pH of different gut compartments can greatly vary from one individual to another. They are also strongly influenced by diseases like inflammatory bowel disease (IBD). So, among all these strategies the most specific seems to be the one using bacterially degradable polymer coatings or bacterially degradable matrix. The colonic microflora is diverse but bacterial quantity in the colon is still much higher than in the rest of the gastrointestinal tract (1000 times greater than in the small intestine). And typically, intestinal bacteria have specific enzymatic equipments absent in the upper gastrointestinal tract (GIT) like degradation of polysaccharide polymers, which makes this degradation colon-specific.

To mimic colonic conditions, different physicochemical parameters must be collected:

- the pH,
- the types of bacteria (different types of bacterial enzymes and their activities),
- a low water content: the colon is the compartment where water and sodium are reabsorbed,
- the colonic peristaltism,

- the temperature,
- an anaerobic atmosphere.

In this review, a brief introduction on the interests and scope of targeted colon formulations with a focus on the bacterially degradable formulation strategy will be presented. The colonic microflora characteristics and the polysaccharides used for colonic targeting are disclosed. The main objective of this paper is to review different drug release test methods for colon targeted formulations, which have been presented during the past 20 years (as no standards exist) and discuss them. *In vitro* methods with the different general use devices, the dissolution mediums, the complex mouth to colon devices and the *in vivo* methods with the use of rats, dogs or humans are an array of such drug release test methods for colon targeted bacterially degradable formulations.

II. Interest, scope and specific strategy for designing colon-targeted formulations

1. Interest and scope

Colonic release systems have been recognized to have significant therapeutic benefits. They significantly improve the treatment of many pathologies involving the colon like IBD, colon cancer [16], irritable bowel syndrome and constipation. Colonic release is also useful in chronotherapies, when, a delay in absorption is needed, especially in diseases such as asthma or nocturnal angina [17], or the treatment of nicotine addiction. The protein or peptide drug absorption is also improved in the colon. This is particularly due to a lower proteolytic activity in the colon than in the small intestine, to the absence of peptidase activity associated with the membrane of epithelial colonic cells and the long transit time that increase the time of contact with absorption surface. There is therefore an interest in the use of the colon as a site of peptidic drug absorption [18] like analgesics, contraceptives, vaccines or insulin usually parenterally administered, which is painful, cause of poor acceptability and can induce infections. The Table 1 shows different examples of targets of colonic drug release with the specific drug and formulation found in literature.

Table 1: Examples of Interests and scope of colonic drug release

Interest and scope	Symptoms	Drug	Formulation	Ref
Inflammatory bowel diseases	Crohn's disease: diarrhea, abdominal pain and cramping, blood in stool, ulcers, reduced appetite and weight loss Ulcerative colitis: inflammation in the rectum, rectal bleeding, rectal pain	Mesalazine	Eudragit® L/S mixture based coating MMX (multi Matrix System) Carbomer 940 and hydroxypropyl cellulose (HPC) colon adhesive pellet coated with Surelease(®)and Eudragit(®)	[19] [20]–[23] [24]
		Budesonide	Chitosan/ Pectin based matrix tablet MMX (multi Matrix System)	[25] [26], [27]
		Prednisolone	Eudragit® RS100 : Guar gum 2: 4 based matrix tablet	[28]
		Parnaparin	MMX (multi Matrix System)	[29]
		Sodium-butyrate	Hydroxy propyl methyl cellulose and Shellac coated tablet	[30]
		Curcumin	Eudragit®-L100-PVA based microsponge Eudragit®-coated chitosan based microspheres	[31] [32]
		Micheliolide	Chitosan Hydrogel	[33]
Colon cancer	Changes in bowel habits, narrow stools, rectal bleeding or blood in stool, persistent abdominal discomfort, such as cramps, gas or pain, abdominal pain with a bowel movement, unexplained weight loss	5-fluorouracil	Eudragit® S100-coated dextran microspheres Ethylcellulose : pectin (8:3 weight ratio) coated pellets	[34] [35]
		Irinotecan	Liposomal carrier	[36]
		Oxali-palladium	β-Lactoglobulin based nanocapsule	[37]
		p 53 polyplex	loaded enteric-coated calcium pectinate microbead	[38]
		Tetrahydro-curcumin	Prodrug	[39]
Preoperative bowel preparation	-	Levofloxacin	Chitosan microspheres	[40]
Chrono-therapy Anti-inflammatory effects properties	-	Quercetin	Chitosan–xanthan gum microparticle-based oral table	[41]
		Biphenyl-acetic acid (fenbufen bioprecursor)	Prodrug	[42]
Diabetes	-	Gliclazide-Cholic Acid	Microcapsule of low-viscosity sodium alginate (LVSA)	[43]
		Insulin	Multiple form	[44]
Irritable bowel syndrome	Abdominal pain or cramping, a bloated feeling, flatulence, diarrhea or constipation, presence of mucus in the stool	Ondansetron	Eudragit® S-100 -chitosan microspheres	[45]
		Mebeverine	Matrix tablets were prepared using ethyl cellulose (EC), Eudragit® RL 100	[46]
Amoebiasis	-	Metronidazole	Sulfate conjugated prodrug	[47]
Diverticulitis	Formation of diverticula on the outside of the colon due to bacterial infection	Bactrim, Flagyl, Sulfatrim, Metronidazole, mesalazine, Rifamixin		[48]

2. Bacterially degradable formulation, a specific strategy

Systems based on the enzymatic activity of the microbial flora are probably the most specific systems for colonic drug release. The intestinal microflora has multiple enzymatic activities (particularly for the degradation of complex polysaccharides like mucins or residues of dietary fiber which are its main substrate) absent in human cells. This makes the microflora a valuable tool for improving colon-targeting.

This concept could be divided into:

- The use of precursors cleaved by bacterial enzymes in the colon [7], [8]. But the presence of the needed enzymes might be compromised in disease [49].
- The use of tools (coatings / matrices) susceptible to colonic bacterial enzymes (avoiding the use of precursors).

a) The intestinal microbiota and its metabolic activity

The human colon is colonized by a dense microflora, this ecosystem is diversified and can contain up to 1000 different bacterial species with a large metabolic potential [50] and represents approximately 10^{14} microorganisms [51]. The colonic microbiota contains at least 1000 times more bacteria than the other parts of the gastrointestinal tract. Despite some deleterious effects (reservoir of potential pathogens), its functions are often beneficial (symbiosis): barrier against pathogens, immunomodulation, the ability to metabolize many substances (under anaerobic conditions which means in a different manner than in human cells), and improves mucosal trophicity and intestinal motility. The colonic microbiome is often presented as a virtual organ. The functions of the digestive bacteria belongs to three types [52]:

- Metabolic functions with the production of volatile short-chain fatty acids (SCFA), improvement of the ionic absorption and recovery, the xenobiotic metabolism, the metabolism of bile acids and the regulation of intestinal transit.
- Protective function of the "gut barrier" by the good adaptation to available nutrients, changes in intraluminal pH and occupation of potential sites of colonization, mainly in the mucus layer by non-pathogenic bacteria.
- Trophic function by facilitating the proliferation and epithelial differentiation and promoting the immune system.

Significant dysbiosis are observed in the digestive disorders associated with antibiotic therapy, irritable bowel disease, diarrheal outbreaks and IBD, but also in gastrointestinal neoplasia, obesity and allergies. The therapeutic manipulations of the microbiota may be via antibiotics but also microorganisms like probiotics or specific substrates like prebiotics. Food can also modulate the microflora to a lower extent [53].

In the colon, oxygen is not available and the metabolism is essentially anaerobic. Endogenous substrates are always present and the most abundant are intestinal mucins. These high molecular weight compounds look like a bottle brush with a central protein core and O-glycans extending in all directions like brush bristles [50]. 80% of the mucin mass are glycans and more than 100 different glycans are observed [50]. The mucins are major parts of the mucus layer which is a continuous protective layer on the intestinal epithelium. The inner layer is nearly sterile and helps to guarantee the sterility of the underlying healthy intestinal epithelium [54]. The outer layer is colonized by bacteria attached to sugar residues of mucins. The bacteria linked to the mucus layer are members of the normal flora with a low pathogenic potential. They occupy potentially all available binding sites which are no longer available for other (potentially more pathogenic) bacteria. The normal flora binds to mucins but is also able to degrade them slowly [55]. As mucins are continuously secreted by the goblets cells, the outer layer is regularly desquamated (Figure 1). So these slowly mucolytic bacteria will never completely destroy the mucus layer. The oligosaccharidic chains of mucins can be of very various length, contain different type of monosaccharides (glucose, galactose, N-acetylglucosamine; N-acetylgalactosamine, fucose, mannose) and different types of linkage (α -1,2; α -1,3; α -1,4; α -2,3; α -2,8; β -1,4 for instance) [56]. Hence mucolytic bacteria need many different types of glycosidases to be able to cleave the different linkages [57], [58]. All these enzymes need to be present outside the bacteria (extracellular secretion or extracellular membrane bound enzymes), high molecular weight mucins are unable to enter the bacteria [57]. Mucolytic intestinal bacteria of the normal flora with a low pathogenic potential belong in humans usually to the genera *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* and *Akkermansia* [55], [57], [59], [60]. Exoglycosidases will release one monosaccharide at a time [50]. Only *Bifidobacterium bifidum* strains are able to secrete also endoglycosidases mainly endo- α -N-acetylgalactosaminidase directly cleaving glycans from the protein core [57], [60].

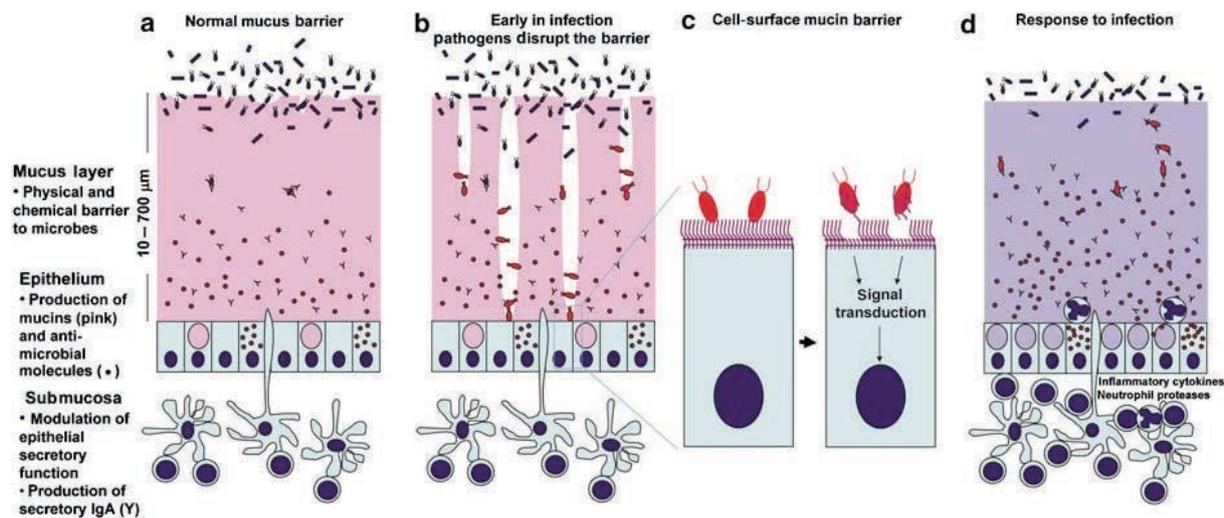


Figure 1 : Diagrammatic representation of mucins in the mucosal barrier to infection. (a) The normal mucosa is covered with a continuously replenished thick mucus layer retaining host-defensive molecules. Commensal and environmental microbes may live in the outer mucus layer but the layer ensures that contact of microbes with epithelial cells is rare. (b) Early in infection, many pathogens actively disrupt the mucus layer and thereby gain access to the epithelial cell surface. In addition, this alters the environment for commensal and environmental microbes and opportunistic pathogenesis may occur. (c) Pathogens that break the secreted mucus barrier reach the apical membrane surface, which is decorated with a dense network of large cell-surface mucins. Pathogens bind the cell-surface mucins via lectin interactions and the mucin extracellular domains are shed as releasable decoy molecules. Consequent to contact with microbes and shedding of the extracellular domain, signal transduction by the cytoplasmic domains of the cell-surface mucins modulates cellular response to the presence of microbes. (d) In response to infection, there are alterations in mucins that are driven directly by epithelial cells and in response to signals from underlying innate and adaptive immunity. These alterations include goblet cell hyperplasia and increased mucin secretion and altered mucin glycosylation (depicted by the color change) affecting microbial adhesion and the ability of microbes to degrade mucus. These changes in mucins work in concert with other arms of immunity to clear the infection [54].

The varied exoglycosidases are also able to degrade exogenous substances, in humans usually plant polysaccharides present in food like pectin, resistant starch and, to a lesser extent, cellulose. The bacteria degrade these polysaccharides non digestible in the small intestine to SCFA. These acids are resorbed by the colonic epithelium; energy is recovered for the human body by bacterial intestinal fermentation. These interactions have gained interest recently establishing a link between the intestinal microflora and obesity [61], [62].

The exoglycosidases of the intestinal bacteria are able to use various substrates. They can be a reliable tool for colon targeting when using non-digestible polysaccharides for drug coating. Pectin and resistant starch have been used with success but structures with different

types of linkages give a more specific approach assuring the presence of a cocktail of enzymes only in the colonic environment. To increase the types of linkages variety, modified polysaccharides are created but require chemical processing. They therefore have the disadvantages of being less available and more expensive than natural polysaccharides, and may be responsible of non-usual digestion products. Coating drugs with natural polysaccharides offers possibilities for colon targeting without any toxic side effects.

b) Polymers specifically digested by the colonic microflora and principal polysaccharides suitable for colon targeting.

The polysaccharidic coating should not be dissolved before reaching the colon. And it should be slowly degraded to ensure efficient concentration of the liberated drug throughout the colon. To ensure the integrity of the coated pellets up to the colon, it can be necessary to mix more or less soluble polysaccharides. Addition of calcium or association with other polymers can also decrease solubility.

The advantages of using polysaccharides are:

- Natural, abundant and cheap,
- Biodegradable,
- Non-toxic (not require toxicity study prior to use in the formulations; already commonly used in the food industry),
- Fermentable in the colon resulting in the formation of SCFA which are rapidly absorbed in the colon and stimulate the reabsorption of sodium and water.

For the IBD treatment, it is necessary that the chosen polysaccharides are specifically degradable by modified intestinal flora of patients suffering from these diseases (Table 2).

Dextrins

Dextrins are polymers of glucose and the most abundant is starch. It occurs as microscopic granules in the tissues of plant species as storage polysaccharide and it is degraded by many different bacterial species. It is composed of two polysaccharides: amylose and amylopectin. These compounds are usually also degraded in the small intestine by human amylases. Amylose is an essentially linear α -glucan containing α -(1,4) bonds. Amylopectin has a much higher molecular weight than amylose and is much more heavily branched, with about 95 % of α -(1,4) and 5 % of α -(1,6) bonds [63]. The amount of amylose usually present in starch is between 20 % and 35 %. Breeders have developed starches

which contain amylose between 50 % and 80 % [63]. Only part of starch, named resistant starch, reaches the colon and are resistant to digestion in the upper GIT. When using these polymers, it should be checked carefully that degradation in the small intestine remains limited. Resistant starch can be manufactured by starch modification until obtaining an amorphous structure (amorphous amylose) which can be degraded by colonic bacteria [64]–[68]. For this reason, glassy amylose was chosen for colonic drug delivery. Only retrograded amylose resists to the upper GIT digestion by pancreatic enzymes [65]–[67]. Amylose has been used in coatings of colon-specific formulations [68].

A disadvantage of amylose in film form is its swelling in aqueous media and subsequent accelerated drug release. Pure amylose films take up considerable amounts of water upon exposure to aqueous media. They become very permeable and the drug is already released in the upper GIT before the distal GIT is reached. To control this swelling, commercially available controlled release polymers (e.g., ethylcellulose EC) have been mixed with amylose in order to prevent drug release in the stomach and small intestine. It has been concluded that the ratio of the amylose to EC and the coating level play a major role in controlling drug release from this system. Mixed amylose:Eudragit® coating dispersion has also been used to delay drug release and target the colon [69]. In fact, Eudragit® is a copolymer of ethyl acrylate, methyl methacrylate and methacrylic acid ester with quaternary ammonium groups present as salts that make the polymers permeable. This polymer is insoluble in water thus when it is mixed with a soluble polysaccharide, it act decreasing its solubility. Eudragit® is not biodegradable but it hydrates in gastrointestinal fluids independent of pH.

Another technique, to reduce the hydrophilicity of amylose is the coupling of amylose with hydrophobic polymers. Ethyl methacrylate (EMA) was grafted onto a high amylose starch in order to make amylose hydrophobic and increasing its resistance to digestive enzymes [70]. To obtain high enzymatic resistance, it was necessary to use large quantities of ethyl methacrylate. In spite of the ethyl methacrylate coating around the amylose, the carbohydrate of amylose-ethyl methacrylate was susceptible to fermentation in the human colon.

Dextrans are a natural class of polysaccharides with a linear polymer backbone with mainly 1,6- α -D-glucopyranoside linkages with side chains of additional α -(1,4) and α -(1,3)-bonds. They are resistant to the action of human amylases, but they have been found to be degraded in human feces due to bacterial action [71]. Various drug-dextran prodrugs in

which the drug molecule is linked to the polar dextran macromolecule remain intact and unabsorbed from the stomach and small intestine but when the prodrug enters into the colonic environment, it is degraded by dextranases. Dextran and 5-aminosalicylic acid conjugates were synthesized and evaluated for drug delivery to the colon [72].

More complex dextrans can be engineered today containing different type of links which make them resistant to human pancreatic enzymes. For instance Nutriose®, a water-soluble and branched maltodextrin obtained from wheat starch, was shown to be particularly promising [14], [15], [63]. Due to the presence of α -1,6 linkages and non digestible glycoside linkages (e.g., α -1,2 and α -1,3), Nutriose® is only incompletely hydrolyzed and absorbed in the small intestine (approximately 10-15 %). But this starch derivative is progressively fermented to about 85 % in the colon [73], [74]. Furthermore, Nutriose® is known to exhibit a significant pre-biotic activity, normalizing the microflora and enzyme patterns in the colon of the patients [73]–[75]. This is of major clinical benefit for this type of GIT diseases.

Inulin

Inulin is a naturally occurring glucofructan found in many plants like onion and chicory. It consists of β -(1-2) linked D-fructose molecules having a glucosyl unit at the reducing end. Inulin is not significantly hydrolyzed by digestive enzymes in the upper GIT, however, colonic bacteria and more specifically bifidobacteria can degrade this polysaccharide conferring a prebiotic effect to inulin [76]. However bifidobacteria are often decreased in IBD [77], [78]. Inulin, with a high degree of polymerization, can serve as a biodegradable compound with Eudragit® RS to lower its water solubility [79]. Inulin can bring the biodegradable aspect to the formulation and mixed films of inulin and Eudragit® RS withstand gastric and intestinal fluids, which indicate that this coating system could also serve as coating materials for colon targeting. The bacterial degradation has been shown to depend on the hydrophilicity of the plasticizer. However, Eudragit® RS and RL in combination with inulin made free films and have been shown more swelling and increase permeation of drug in colonic medium rather than in gastric and intestinal fluids [80].

Pectin

Pectin is a non-starch linear polysaccharide that consists mainly of α -(1,4) D-galacturonic acid and α -(1,2) L-rhamnose, found in the cell walls of plants. It is not digested in the upper GIT but is completely degraded by colonic bacteria [81]–[84]. The disadvantage of pectin is its solubility. To overcome this restriction the degree of its methoxylation can be

modified and calcium pectinate can be prepared in order to make pectin resistant in the upper GIT [81]. Combination of pectin and ethylcellulose have been used to coat paracetamol tablet cores [85]. Drug release was depended on the nature and characteristics of the mixed film as well as the composition of the dissolution medium. 5-Aminosalicylic acid beads coated with pectin:EC were prepared and evaluated for drug delivery to the colon. Results of this study reveals that simulated gastric fluid was found to influence drug release (hydration and swelling characteristics of pectin), and also the ratio of pectin to EC in the coat [86]. Pectin has also been investigated in combination with other polysaccharides as chitosan [87], [88] and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) [89]. And finally, a combination of a divalent cation (Ca^{2+}) and a cationic biopolymer oligochitosan has shown to improve the stability of a pectin-based hydrogel systems in the literature suggesting that these two cross-linkers may be used to eventually help improve pectin-based hydrogel systems for colonic drug delivery methods [90].

Chitosan

Chitosan is a natural amino polysaccharide. It is obtained by the alkaline N-deacetylation of chitin, the second most abundant polysaccharide in nature after cellulose found in the exoskeleton of crustaceans and in fungi. Chitosan is a copolymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine [91], [92]. This polysaccharide is degraded by the colonic microflora [93], and it is not digested in the upper part of the GIT by human digestive enzymes [94]. Chitosan is already used in oral drug formulations to provide colonic drug delivery and these systems are discussed by various researchers [95]. Insulin and 5-aminosalicylic acid have been administered to rats in enteric-coated chitosan capsules. It is also considered as a promising candidate for colon targeting because of its favorable biological properties (e.g., non-toxicity, biocompatibility and biodegradability). Recently, a tablet formulation was developed using chitosan: guar gum as carriers in the matrix-tablet, and then was coated firstly with inulin as inner coat, and secondly with a shellac gum as outer coat [96]. Another innovative system consists on chitosan-Kollicoat® Smartseal 30 D film-coated tablets has been described for drug colonic release [97].

Galactomannan

β (1-4) galactomannans occur naturally in carob seeds. Another galactomannan is guar gum, obtained from the ground endosperms of *Cyamopsis tetragonolobus*, it is a galactomannan material composed of linear chains of (1,4)- β -D-mannopyranosyl units with α -galactopyranosyl units linked by (1,6) bonds [98]. Guar gum is composed on water-soluble part (85%, guaran), and water insoluble-part [99]. Crosslinked guar gum has been

used as a drug matrix tablets [100], [101]. A study described the encapsulation of cyclodextrin complexes in bioresponsive guar gum microspheres to improve solubility and enhance colonic delivery of reduced bromonoscaphine [102].

Alginate

Naturally present in seaweed, alginates are polymeric blocks of (1-4) linked β -mannuronate and α -guluronate. Like pectins, gel forming is only possible when the structure is modified by addition of Ca^{2+} ions. The gelation of alginates can be induced by adding Ca^{2+} ions because alginates do not gel since they have poly (L-guluronic acids) which are rigid. 5-aminosalicylic acid has been sprayed on calcium alginate cores for the use in targeted drug delivery system [103]. These beads were coated with different percentages of enteric coating polymer and/or sustained release polymer (Eudragit® L 30D, Aquacoat). Alginate beads were also coated with dextran acetate [104].

Arabinoxylan

Arabinoxylans are naturally present in *Psyllium*, they consist of β (1-4) linked D-xylose with attached arabinose moieties. This polysaccharide is not degraded by human digestive enzymes but by colonic microflora bacterial enzymes to form SCFA [105]. It is thus already used for these dietary effects but no documented study shows the use of this polysaccharide as coating formulation for colonic release.

Chondroitin sulfate

The only polysaccharide of animal origin used for colonic delivery is chondroitin sulfate. It contains α -glucuronic acid linked to sulfated N-acetyl-galactosamine. It is soluble in water and cross-linking is necessary to be effective in colon drug delivery. Chondroitin sulfate can be used as a carrier for colon targeted delivery of bioactive agents. In contrast to natural chondroitin sulphate, which is readily water-soluble and not able to prevent drug release in the upper GIT, cross-linked chondroitin sulfate will be less hydrophilic and thus will provide a better drug controlling in the stomach and small intestine. Cross-linked chondroitin sulphate in matrix formulations with indomethacin as a drug carrier has been investigated to control drug release in the colon [106].

V.Bansal et al. described other mono-, di- and polysaccharides potentially used for colonic targeted drug release as cellulose, hyaluronic acid, cyclodextrin or scleroglucan, but their use remains anecdotal [99].

In conclusion, polysaccharides suitable for colon drug delivery mediated by the intestinal microflora should either contain monosaccharides or show linkages not digested by human enzymes. These polysaccharides should be fermented by several types of microorganisms in order to guarantee the free set of the drug in different conditions (with or without inflammation) and to avoid release decrease because specific bacteria are diminished in disease like bifidobacteria in IBD.

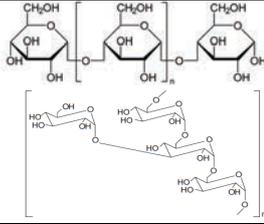
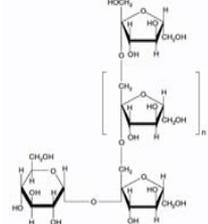
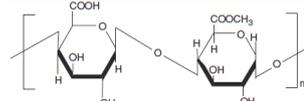
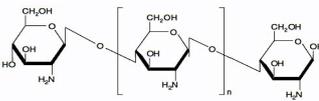
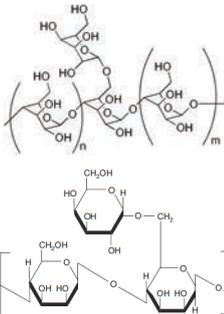
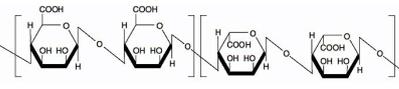
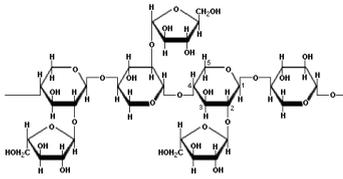
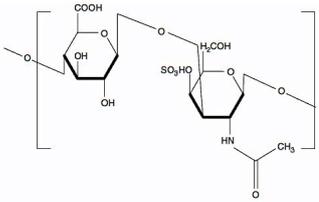
Polysaccharides	Structure	Structural unit	Origin
Dextrins / Dextran		α -1,6-D-glucose	The most abundant polysaccharides secreted by organisms.
Inulin		Molecules of D-fructose with a glucosyl unit at the reducing end of the links connected by β -(1-2)	Different vegetables such as onion and chicory
Pectin		α -D-(1,4)-Galacturonic acid and α -L-(1,2)-rhamnose	Plant cell wall
Chitosan		Copolymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine	Exoskeleton of crustaceans and fungi
Galactomannan / Guar Gum		β -D-(1,4)-mannopyranosyl and α -galactopyranosyl connected by links (1,6)	Plant seeds including carob seeds
Alginates		polymer (1-4) with bonds β -mannuronate and α -guluronate links	Present in algae
Arabinoxylans		D-xylose linked by β (1-4) linkages and arabinose fragments	<i>Psyllium</i> (cell wall and seeds of plants)
Chondroitin sulfate		α -glucuronic acid bound to N-sulfate-acetyl galactosamine	Cartilaginous tissues of many invertebrates

Table 2: Summary of polysaccharides used for drug colonic targeting

III. In vitro test methods

1. General use devices

Dissolution devices described in the European Pharmacopoeia (and United State Pharmacopoeia, USP) are standardized and can be applied easily. These devices are divided in four groups: the basket apparatus (apparatus I), the paddle apparatus (apparatus II), the reciprocating cylinder (apparatus III) and the flow-through cell (apparatus IV) (Figure 2). These devices have standard dimensions, with a defined dissolution medium volume and a level of agitation calibrated. These characteristics make their use more legitimate and allow comparison with others results of formulations release. The baskets apparatus is often used in the case of multiparticulate formulation (pellets for example) or with formulations which present the characteristics of floating or sticking to the vessels walls and therefore would no longer be in contact with the dissolution medium [107]–[112]. Paddle apparatus is the most widely used technique and has the advantage of being easy to implement [10], [113]–[120]. The volume of medium used is about 900 ml with paddle apparatus. The reciprocating cylinder apparatus is a device that mimics better digestive peristalsis movements than rotational movements of the paddles [15], [121]. Programmable devices exist such as Biodis® that allow setting up changes of dissolution media and levels of agitation. The volume of medium used is about 200 ml with the BioDis® apparatus. Finally, the flow-through cell allows testing the release of formulation with a constant renewal of dissolution medium [12], [122], which is not the case with the other devices previously described.

Sink conditions have to be maintained. These are the conditions for making a valid dissolution test, that is to say, the use of a sufficient dissolution medium volume to avoid saturation effect and a modified formulation drug release.

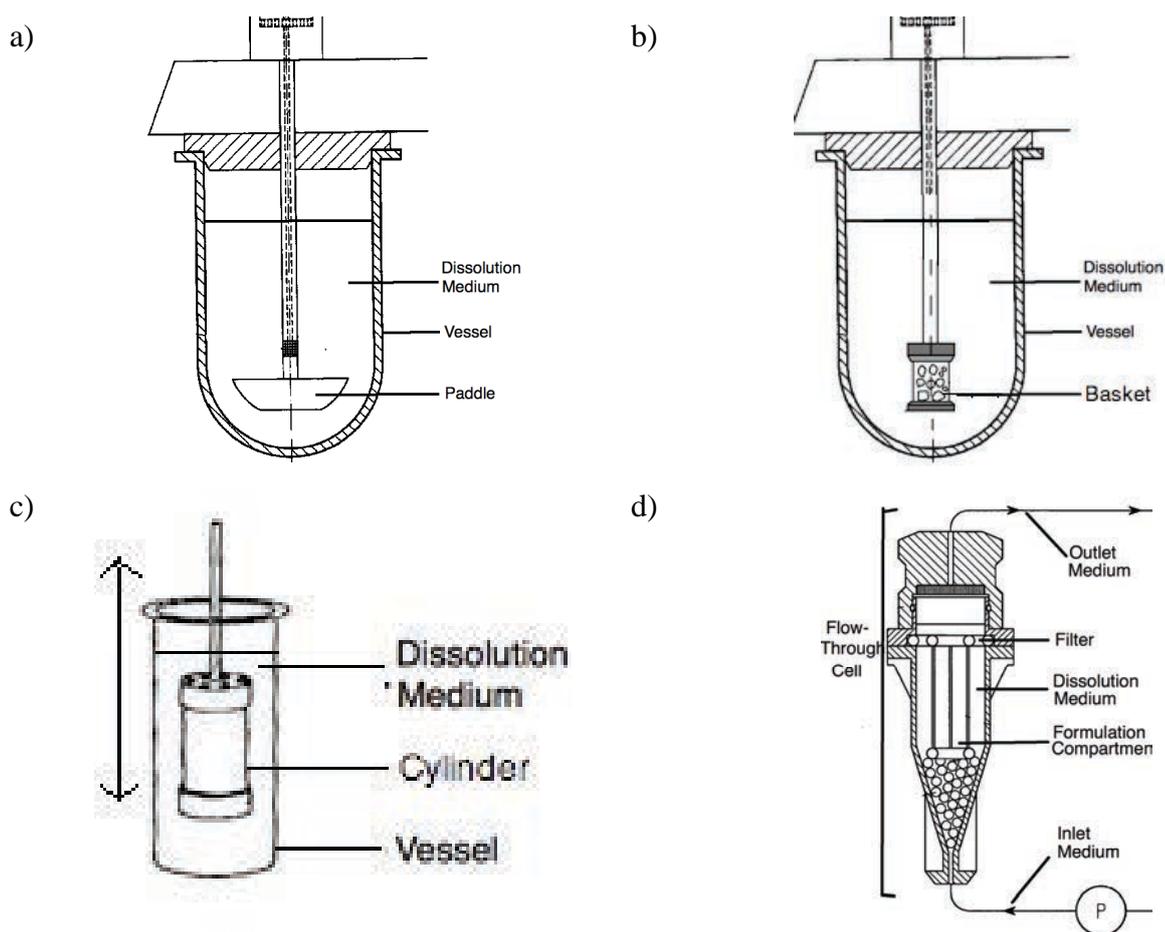


Figure 2: Dissolution devices described in the European Pharmacopoeia and USP. a) USP I apparatus, or the basket apparatus; b) USP II apparatus or the paddle apparatus; c) USP III apparatus or the reciprocating cylinder apparatus and d) USP IV apparatus or the flow-through cell.

There are devices for the *in vitro* drug release test methods for colon targeted formulations that consist on a simple vessel containing the dissolution medium in a heating and stirring chamber copying physiological conditions (temperature and digestive peristalsis). Such a technique is used in the case of nanoparticles release or release of formulations requiring a low volume of dissolution medium which is not compatible with the apparatus described in the European Pharmacopoeia or USP. This technique has the disadvantage of not being standardized by using containers of different sizes in which stirring of the medium can be different and can lead to variations in drug release results.

2. Gut's compartment simulation

a) Gastric conditions simulation

The gastric conditions are most often simulated by the use of an hydrochloric acid solution HCl 0.1 M with pH 1,2 [123]. The agitation rate is 100 rpm with the paddle apparatus instead of 10 rpm with reciprocating cylinder apparatus. The dissolution medium is maintained at 37°C to mimic the physiologic conditions. The gastric simulating time is commonly fixed at two hours but European and United States Pharmacopeia don't recommend any specific time. In some studies, gastric enzymes are used such as pepsin [121].

b) Small intestine conditions simulation

Small intestine conditions are less well defined. Indeed, the ileal compartment may be divided into different compartments (the duodenum, the jejunum and the ileum) with pH selected to mimic these conditions which can vary from 5,5 to 7,5. European Pharmacopeia [123] recommend to test dissolution for buffer stage in phosphate buffer with pH 6,8. Some studies break up completely the the small intestine crossing in different times and pH (table 3).

Simulated GI segment	Exposure time	Release medium	pH
Stomach	2 h	0.1 M HCl	1.2
Duodenum	0.5 h	Phosphate buffer (Eur. Pharm. 5)	5.5
Jejunum-ileum	9 h	Phosphate buffer (USP 30)	6.8
Caecum	0.5 h	Phosphate buffer (USP 30)	6.0
Proximal colon	6 h	Phosphate buffer (USP 30)	7.0
Distal colon	18 h	Phosphate buffer (USP 30)	7.4

Table 3: Dissolution media used to simulate the gradual increase in pH along the gastrointestinal tract [15]

In some studies, small intestine enzymes are used such as pancreatine or extracts from rats intestine [121]. Transit time in the small intestine may be also very variable across studies. Indeed, some studies put the formulation in contact with the intestinal simulating fluid for 2 hours [10] while others go as far as 9 hours [15]. The simulated transit time in the small intestine can be chosen depending on whether the author wants to mimic standard conditions (3h) or extremes conditions (9h) found in digestive diseases. The agitation rate is 100 rpm with the paddle apparatus instead of 5 rpm with reciprocating cylinder apparatus. The dissolution medium is maintained at 37°C to mimic the physiologic conditions.

Formulations releasing much of the tested drug during these first two steps are usually not tested under colonic conditions as they do not respond to the aim of the work.

c) Colonic conditions simulation

The colonic conditions are most often simulated by the use of medium with pH 7.4. European Pharmacopeia doesn't recommend any specific medium. Thus, many techniques are then used. The analysis time in colonic conditions are not standardized. It can range from 10h [124], 14h [125], 18h [94], [126], [127], 19h [94], [118], [119], [128], [129], 20h[10], to 21h [130] depending on studies.

Phosphate buffer

Pure phosphate buffer

Some teams use only phosphate buffer whose pH range from 6.8 to 7.5 [131]–[133]. This technique can be used legitimately when tested formulations are time-dependent or pH-dependent. But some studies claiming to test formulations sensitive to colonic bacterial enzymes using a colonic simulating medium only composed by phosphate buffer pH 7.4. It is unreasonable to prove a colonic targeting of these formulations by this method because it mimics a single colon's physical criterion, the pH.

Chitosan-prednisolone conjugate microspheres have been coated with Eudragit® L 100 and evaluated *in vitro* at different pH levels [134]. Microspheres coated with Eudragit® are able to protect drug in simulated gastric fluid but once the pH increased to 6.8 the release rate of the microspheres increased significantly.

This technique is not very specific. Indeed, the formulations with a targeted release in the colon serve in general to treat colonic pathologies. These are often associated with disruption of transit time or pH of the different gut's compartments (particularly due to a bacterial imbalance). Thus, simulating the colonic medium with a buffer solution is too simplistic since microbial enzymes are not present.

Phosphate buffer with colonic bacteria enzymes

From the moment on bacterial or enzymatic colonic conditions want to be respected, it is necessary that the dissolution medium used is anaerobic and that must be the case until the release test ends. Thus, the medium is placed in the anaerobic chamber or dissolution flasks that maintain this environment. Some teams use phosphate buffer in whom they add a single or multiple bacterial enzymes usually present in colon [135], [136]. Enzymes such as β -galactosidase [124], [125] are artificially added to the medium in quantity randomly determined. Mesalazine-tablets coated with amylose:EC blends have been also investigated exploiting gastrointestinal bacterial enzyme (α -amylase) to trigger mesalazine release from

amylose-based systems [137]. The performance of amylose:EC coated formulation (ratio 1:1 and 15 % coating level) has been evaluated *in vitro* with four commercial amylase enzymes and fresh fecal sample in phosphate buffer [6] (Figure 3). From the results of *in vitro* studies it was concluded that amylose:EC coatings could suppress drug release in the upper GIT depending on the coating thickness and also on the polymer:polymer ratio. Contrary to immediate release formulation in which the drug rapidly released and absorbed into the blood stream, enteric formulation delayed drug until they come into the small intestine (most of them), but the amylose based coating retarded the drug release until the pellets had reached the colon.

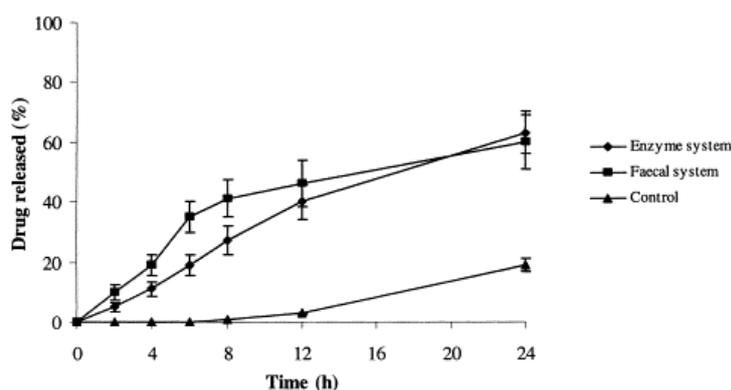


Figure 3: 5-Aminosalicylic acid release from amylose–ethylcellulose coated pellets in batch culture fermentation systems (enzyme and faecal) and control (mean±S.D.) [6]

Several works studied the drug release from enteric-coated calcium pectinate microspheres or combine of pectin, Eudragit® RS and Eudragit® RL in the matrix of pellets in pH 7.4 phosphate buffer in the absence or presence of 0.375 mL or 0.6 mg/mL pectinolytic enzymes [138]–[140]. Drug release from alginate beads coated with dextran acetate [104] was significantly faster in presence than in absence of dextranase. The use of enzymes that specifically degrade the coating of the formulation or split the links of prodrug is artificial. Indeed, it is certain to observe a drug release effect in these simulated colonic conditions. No studies have determined the presence and amount of these enzymes really present in the colon of patients suffering from digestive pathologies. In these studies, the medium's pH chosen is a compromise between the simulated colonic pH and the optimum pH for enzyme activity. In patients with digestive diseases, enzymes can be present in smaller quantities, absent or inactive, because of a different digestive pH.

Phosphate buffer with rats' caecal content

Phosphate buffer inoculated with rats caecal contents is often used to mimic colonic conditions. To achieve this artificial colonic medium, rats were sacrificed and the caecal

content is retrieved. In these studies, the medium contains 2% [10] [118], [129], 3% [94], 4% [124], [128], [141], 8% [142] or 33% [125], [126] of caecal content. Some teams practice "enzyme induction" [10], [118], [127]–[130], [141] by imposing a specific diet to rats. This diet is enriched or rats are fed by intubation [94] with a substance of interest for which degradation is desired (component of coating or in formulation core). The changing of feed causes an overproduction of enzymes guided against this substance. Thus, the rat caecal content is enriched in enzymes that accelerate the drug release of the formulation. This method is slightly rigged and doesn't correspond to the normal drug release conditions. During the caecal content preparation, some methods include steps of filtration and sonication [10] to eliminate bacteria in medium and keep only the excreted enzymes. Sonication can be used to access to intracellular bacterial enzymes. Similarly, this technique digresses from real drug release conditions where formulation is in contact with bacteria and enzymes induced.

Eudragit® S-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil have been evaluated for colonic release in order to reduce drug's side effects caused by absorption in the upper GIT part. As expected, drug release could be suppressed in simulated gastric fluid and triggered at pH 7.4. A matrix-tablet formulation based on chitosan: guar gum composition and coated firstly with inulin as inner coat, and with a shellac gum as outer coat [96] was investigated and drug release from this formulation was controlled in gastric and intestinal fluids, however, it was found to be enhanced in the presence of rat caecal contents. *In vitro* indomethacin release upon exposure to phosphate buffer with and without rat caecal content has shown that the faster drug release depended on the biodegradation action of bacterial enzymes [143].

Finally, a study has even used the goat caecal content, following the same procedure than with the rat one. "Whole gastrointestinal tract of goat was commercially collected from the slaughter house immediately after sacrifice of goat and was stored in physiological solution (previously bubbled with CO₂) at 8°C before use. 900 ml of goat caecal content was taken into the beaker of dissolution apparatus"[144] (Figure 4).

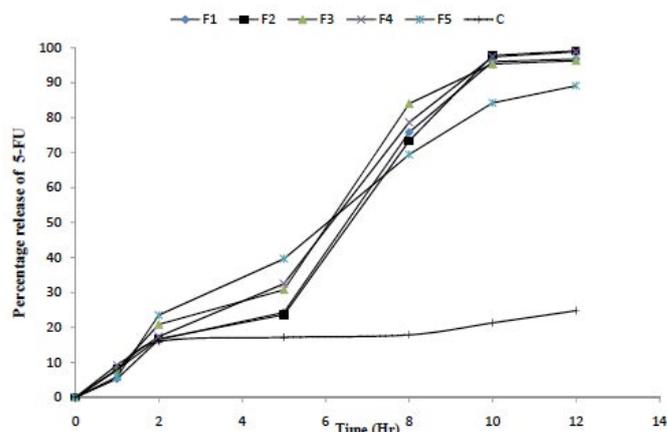


Figure 4: Percent of 5-FU released from compression coated tablets (n=3) of Assam Bora rice starch coat in in-vitro release study with goat caecal content (F1-F5) and without caecal content (C) [144].

In Paharia et al. *in vitro* drug release study in the presence of rat caecal content have shown that there are no/slightly difference between the release profile in the presence and absence of caecal content [10].

Phosphate buffer with rats' fresh faeces

Other studies use rat feces instead of the caecal contents [145]. The stool contains representative bacteria of the colonic bacterial population and are easier to obtain than the caecal content. Nevertheless, the stools are dryer and can have a pH different than caecal content, which can cause a modulation in the bacterial population's variety and a decrease in the survival of bacterial strains if the sample collection and their use are not fast enough. Techniques using animals caecal contents or animals feces are interesting and relatively easy to implement, however, they remain distant from physiological conditions of drug release. The human colonic microflora is different from that found in animals one. Nutrients and enzymes found from these animals colon must also be very different from the human caecal environment. Thus, this method is still not the most suitable for the human colonic conditions simulation as microflora is genus-specific and rather different in various animal species and humans.

Phosphate buffer with human fresh faecal sample

Coated 5-aminosalicylic acid pellets with amylose:EC in a ratio of 1:4 (w/w) have been shown to be resistant to gastric and intestinal fluids but fermentable by human colonic bacterial enzymes [68]. In this study, a preparation of faecal sample has been homogenised in anaerobic phosphate buffer pH 7.0 and, after centrifugation, the cell free supernatant fraction has been used to test the drug release from formulation. Basit et al. evaluated the

colonic release of theophylline loaded pellets coated with an amylose:ethylcellulose blend at a ratio 1:3 and 20% of coated level [146]. The *in vitro* drug release study has been performed in colonic simulated medium consisting on faecal samples collected and pooled from three healthy volunteers and diluted to 10% by homogenising with pH 6.8 phosphate buffer (Figure 5).

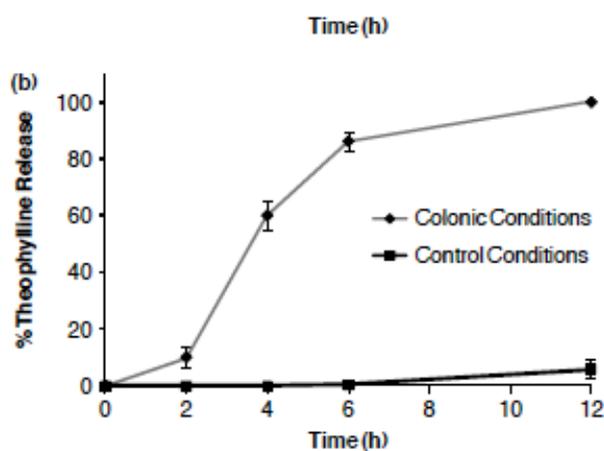


Figure 5: *In vitro* theophylline release in control conditions (pH 6.8 phosphate buffer) and colonic conditions (pH 6.8 buffer inoculated with 10% w/w human faecal material).

Methods using healthy volunteers faeces are not the best suited for the simulation of colonic drug release systems. Patients suffering from colonic pathologies potentially have bacterial flora, pH, and a colonic transit time modified.

Phosphate buffer is not a culture medium, no bacterial growth will occur and only enzymes already present can act. But enzymes for polysaccharide breakdown are often inducible (this is best known for the genus *Bacteroides*). The induction does not take place without bacterial growth.

Culture medium

Culture medium with rats' fresh faeces

Sometimes culture mediums are used to enhance the bacterial growth and their enzyme production. In Sharma R. et al. study, culture medium was inoculated with rats faeces to grow colonic bacteria present in the feces and study the drug release from prodrug through the action of azoreductases [147]. The culture medium should be adapted to the predominant bacterial genera found in humans which is not found systematically in the literature.

Culture medium inoculated with pure cultures of human colonic bacteria

Some studies used a dissolution medium consisting on a culture medium inoculated with one or several bacteria present in the human colon. The bacteria used must be able to growth under anaerobic conditions, be present in large quantities in the colon and preferably must have a low pathogenic potential. Araujo V. et al. have used for example a strain of *Escherichia coli* cultured in Luria-Bertani Broth [148]. The choice of *E. coli* may be biased because this bacterium grows in aerobic and anaerobic conditions, thus, its cultivation is facilitated (particularly in the study where the release test is carried out under aerobic conditions with a suitable medium) and its potential degradation of polysaccharides-coating is important and known.

Culture medium with human fresh faecal sample

To get closer to the human physiological conditions, healthy human fresh faecal sample can be used [121]. The use of the whole stools allows testing the action of the bacterial mixture present in these stools. Bacterial interactions are possible, the growth of one type can favor the others growth. To accurately mimic colonic conditions of patients treated by the colon targeted drug release formulations, stools of patients suffering from digestive diseases such as IBD can be used [121]. Y.Karrout et al. [7], [15] have tested Eurylon 6 HP-PG:ethylcellulose or Nutriose:ethylcellulose (a hydroxypropylated and pregelatinized high amylose starch) film coating pellet with culture medium inoculated with faecal samples from IBD patients (Figure 6). The conclusion of this study was that the presented drug delivery system is adapted to the pathophysiological conditions in inflammatory bowel disease patients.

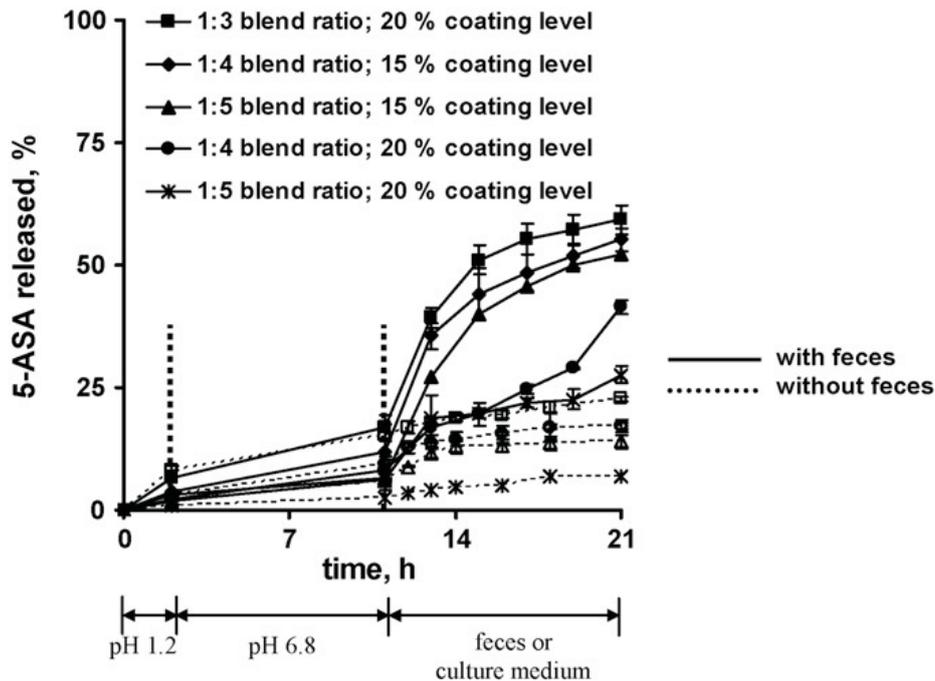


Figure 6: 5-ASA release from pellets coated with Nutriose:ethylcellulose blends (the ratio is indicated in the figure) at 15 or 20% coating level under conditions simulating the transit through the entire GIT, with fecal samples from inflammatory bowel disease patients. The dipping speed was 10 dpm. For reasons of comparison also drug release in culture medium without fecal samples is shown (dotted lines) [15].

Faeces samples must be placed in an anaerobic atmosphere and used as soon as possible to maintain the colonic microflora intact. The drug degradation by colonic luminal flora composition have been evaluated by Tannergren C. et al [149]. In this study, fresh human, rats and dogs feces are used and placed in anaerobic chamber within 10 minutes and used within 30 minutes after sampling. These faeces are prepared in physiological saline and incubated in anaerobic chamber stirring.

The method, which seems to be the most realistic, is the use of medium inoculated with patient faeces that would recreate the dissolution medium closest to the human colonic medium. Bacteria in the human faeces are those, which are found in greater amounts in the colon. The culture medium used to represent the nutrient compound colonic environment but also other components such as mucin in the colon's light.

3. Continuous culture system: the example of SHIME

There are very complex systems to simulate the entire gastro-intestinal tract from the mouth to the colon. These systems can mimic the environment of the various compartments of the GIT with their specificities as pH, nutrients content, enzymes and bacteria. The Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (the SHIME system) is an example of this system. This simulator consists on an ecosystem, a dynamic model scientifically

validated, composed of 5 reactors simulating sequentially the stomach, the small intestine, and the three regions of the large intestine (ascending, transverse and descending colon). A control of environmental parameters allows obtaining complex and stable microbial communities, approaching the physiological structure and function of the gastrointestinal microbiota. The faecal sample of one healthy donor is inoculated in the model (Figure 7).

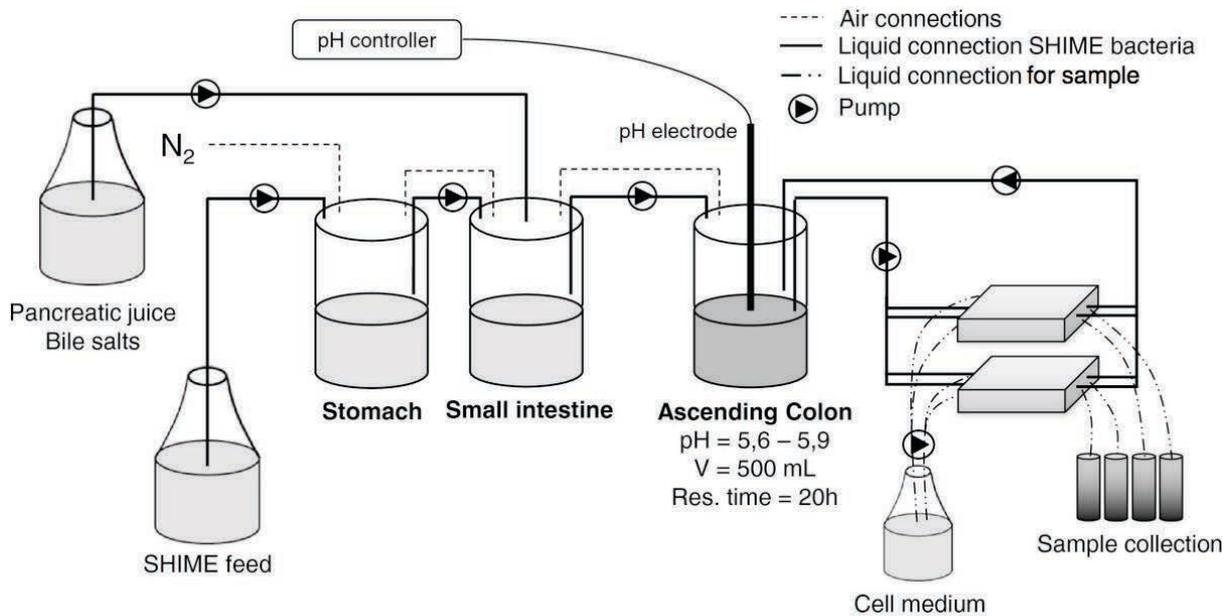


Figure 7: Scheme of the SHIME system

This system allows studying the metabolic fate of dietary compounds or pharmaceutical products in the digestive tract. The large disadvantage of this method is the equilibration time. Indeed, it requires two-week of stabilization [150]. The total anaerobe counts in the colon stage were $1.1 \cdot 10^8$ CFU. mL⁻¹, the total aerobe concentrations were $2.25 \cdot 10^7$ CFU mL⁻¹ and included enterobacteria, bifidobacteria, enterococci, staphylococci and clostridia. This colon digest was maintained between pH 5.9 and 6.3, as observed in the human ascending colon, incubated at 37 °C and stirred at 150 rpm for 18 h. The headspace of the SHIME was regularly replaced with nitrogen gas to maintain anaerobic conditions. This system can be used to evaluate the prebiotic activity of substances [151], [152]. In this study, the SHIME colonic vessels were inoculated with a faecal sample of a young adult male volunteer with no history of antibiotic treatment or colonic disorders 6 months prior to the study. The freshly voided faecal sample was diluted and homogenised with phosphate buffer. After the stabilization phase, colonic compartments underwent treatment with fructan and the effects on the bacterial flora were investigated.

This simulator is widely used to study the effect of a particular diet or medication on intestinal microbiota or conversely, to study the release of drug formulations in the gastrointestinal tract. But this system is very complex. Environments of each compartment can be very different between studies and harmonisation remains difficult to obtain. Moreover, it is difficult to simulate a standard gastric contents. It will remain very different between each individual and period of the day. The gastric content fixed composition can have a reverse effect, to disgress from physiological conditions.

There are derivatives of SHIME system with simplified systems with a reduced number of reactors [153], [154] or more complete one with the Twin SHIME [155] in which two SHIME systems are executed in parallel to perform comparison between different products or with placebo.

The disadvantages of this complex system are the analysis of only one fecal sample which take about three weeks due to the long-lasting stabilization period. The bacterial communities will be selected by the substrates introduced in the reactor which are not the same as the complex substrates ingested in human diet.

IV. *In vivo* methods

1. Animal models

Animal models for oral administration drug release studies are numerous and can go from mice through rats, to dogs [115] or goats. These models can be selected based on the drug, the formulation or the targeted digestive compartment. There are healthy animal models and animal models suffering from digestive diseases, such as colitis induced by TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) [145]. The formulation administration to animals can be directly through diet or through a cannula or tube feeding directly into the stomach. After administration, there are different methods to study drug release.

Animals may receive pretreatment which induces the enzymes production that improve the drug release from formulation. Rats can receive treatment consisting on a dispersion of pectin once a day for 7 days prior to administration of a formulation coated with pectin and ethylcellulose [116], [124].

The evaluation of *in vivo* drug release in animals' colon can be studied by various techniques such as the celiotomy, kinetic blood study, histopathological features monitoring or imagery technics.

f) Celiotomy

Celiotomy can be used to evaluate the gastro intestinal transit. Formulation's transit can be studied counting the number of formulation present in the stomach at a defined time [116]. This technique requires the sacrifice of many animals, it is therefore not the reference technique for the study of drug release from dosage formulation.

g) Kinetic blood study

Blood samples at regular time can be achieved in animals and the drug assays can determine the amount of drug released and absorbed [40], [115]. This technique has the advantage of measuring the amount of drug absorbed. Indeed, drug can be released in gut but not absorbed and does not reach the blood. The limits of drug quantity analysis in the blood would be those of analytical techniques. The separative chromatographic methods are used to determine drug concentration in a complex media such as blood plasma. However, these techniques are not always very sensitive and their limit of quantification is often higher than the drug concentrations present in the body *in vivo*. More sophisticated and less accessible techniques, such as mass spectrometry, are often required to perform this type of study. Another limitation may be the drugs enzymatic degradation by enzymes of plasma and intestinal enzymes that transform the drug molecules prior to their absorption across the intestine wall.

h) Histopathological features

Monitoring the disease evolution, the symptoms and weight of the animal, can assess the drug release [145] The course of the disease can also be studied by observing the evolution of biochemical or histological parameters such as dosing cytokine or markers.

Histopathological features can be assessed after animal's euthanasia with microscopical studies. This technique requires the sacrifice of many animals, it is therefore not a reference technique for the study of drug release from dosage formulation. The results of these techniques have the advantage that they could be analyzed in blind to avoid subjectivity.

i) Imagery

X-ray imaging or radiolabeled molecules [156] can be used in the administered formulation to follow the drug release evolution. The use of imaging tools require special, innovative, expensive equipments and specific training is often needed.

Chitosan-Ca-alginate microparticules have been prepared and characterized to deliver 5-aminosalicylic acid to the colon after oral administration [157]. Dissolution and biodistribution studies of ¹³¹I-labelled 5-aminosalicylic acid after oral administration of these microparticles to rats have shown an intensive mucoadhesion and controlled colon-specific delivery [158].

The disadvantage of this method is that imaging in small animals is not very precise and it is difficult to differentiate a colonic drug release and ileal drug release.

The *in vivo* test on animals most often associated some of analysis methods described previously. Y.Karrouit et al. [159] prove the superiority of a proposed microbial sensitive film coatings based on Nutriose:EC and peas starch:EC for colon targeting *in vivo*, in rat and mice models. Numerous methods have been used to test the effectiveness of these new formulations including macroscopic and histological evaluations, the monitoring of inflammation markers, the real-time PCR analysis of HMGCS2 mRNA and PPAR- γ mRNA, the N-acetyl 5-ASA plasma level and the monitoring of PPAR- γ activation (Figure.8).

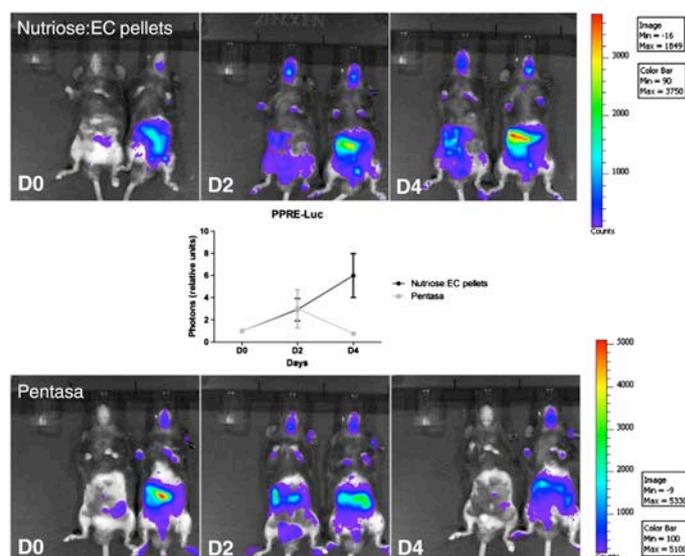


Figure 8: *n vivo* activation of PPAR γ in transgenic mice receiving Nutriose:EC coated pellets or Pentasa pellets orally during 4 days. The receptor activation was measured via bioluminescence emission on day 0 (D0), day 2 (D2) and day 4 (D4). The color scale indicates the degree of activation. In one row, the same two animals are shown in each picture. The diagram plots the relative amounts of emitted photons as a function of time for the two mice groups [159].

All these techniques are intended to prove the colonic drug release and show anti-inflammatory efficacy of drug.

Animal models constitute an unavoidable step in modeling colon targeting but important differences exist between human and animal colonic microbiota. While in humans bifidobacteria and *Bacteroides* predominate, lactobacilli are usually found at high levels on the intestinal mucosa of mice and rats. They also display high levels of glycosidases, but structure and activity of these enzymes are not well known and different of the human colonic microbiome.

2. Human in vivo method

Clinical trials on healthy volunteers and patients suffering from digestive diseases are complicated to implement because of strict regulations. There is a request for authorization to conduct clinical trials on humans that must be requested nearby health authorities, with a passage at the person protection committee. There is especially clinical trials drug formulations that must be manufactured in pharmaceutical facilities and not in research laboratories. Thus, collaboration with pharmaceutical industry are beneficial to be able to

reach this level of formulation evaluation. That is why not much *in vivo* studies of colonic release in humans are described.

a) Assays in physiological fluids or contents

Blood, serum, urine, intestinal content or stool's assays can be performed in healthy volunteers [160] or patients suffering from gastrointestinal diseases to assess the pharmacokinetics of administered drugs.

A formulation which provides improved controlled targeted release of an oral administration of prednisolone sodium metasulphobenzoate to the colon has been developed in order to decrease systemic absorption and consequently low risk of systemic adverse events of corticosteroides. The formulation comprises prednisolone sodium metasulphobenzoate surrounded by glassy amylose:EC (ratio from 1:3.5 to 1:4.5) plasticized with dibutyl sebacate [161]. The formulation has shown that the drug delivery starts when the dosage form arrives in the colon. An EC:glassy amylose surrounded formulation is now available as COLAL®, which has been used to coat pellets containing the corticosteroid prednisolone sodium metasulphobenzoate (COLAL-PRED®; Alizyme Therapeutics Ltd, Cambridge, UK). This product has achieved successful Phase II clinical trial results [162] and is now in phase III clinical trials for the treatment of moderate to severe ulcerative colitis.

The use of biological drug content assay is quite easy to implement but don't materialize exact location of drug release. A drug released in the small intestine or in the colon can reach the blood compartment at the same time if the transit time is disturbed.

b) Radiography and scintigraphy

Labeled molecules on X-ray imaging can be used in the administered formulation to follow the drug release evolution [117]. Radiolabeled molecules can be used in the administered formulation to follow the drug release evolution by scintigraphic images [12], [113], [163] (Figure 9). Scintigraphy is a medical imaging method which proceeds by the administration of radioactive isotopes to produce a medical image by detecting the γ radiation emitted by these isotopes after uptake by the organs to be examined. The advantages of scintigraphy are observing the drug release from the formulation under normal physiological conditions and with a non-invasive technique. The difficulty of this technique is to find a labeled molecule (which can be detected when the scintigraphic examination)

that behaves in the same way as the drug of interest, that is to say which has the same physicochemical properties.

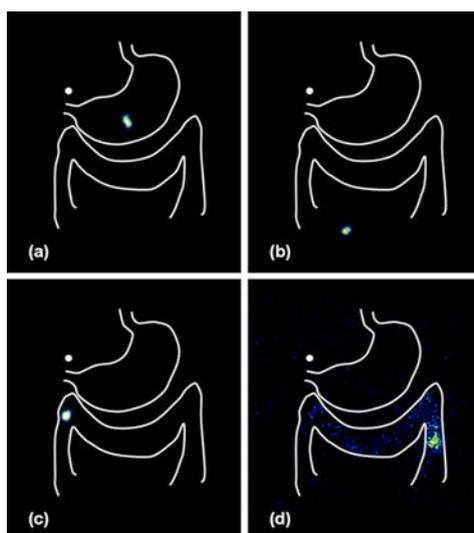


Figure 9: Scintigraphic images of key events in the GI transit of the Geometrically Long Absorption Regulated System tablet in Subject 003: (a) 60 min, tablet located in stomach; (b) 180 min, image at which GE confirmed, tablet in small intestine; (c) 330 min (onset of radiolabel release, tablet in ascending/transverse colon) and (d) 765 min (complete radiolabel release, tablet in descending colon). Outlines of stomach and colon are drawn for visualisation only. The white circle represents the radioactive marker on the subject's chest [164].

Using gamma camera pectin-coated tablets disintegrate during transit in the colon [12]. Pectin/chitosan and HPMC mixtures have been investigated as a film coating system for colonic delivery, forming in situ polyelectrolyte complex between pectin and chitosan [88]. *In vitro* and *in vivo* investigations were carried out using such systems. Radiolabelled (^{99m}Tc) tablets were coated with a 3:1:1, pectin:chitosan: hydroxypropyl methylcellulose film, administered to human volunteers and the gastro-intestinal transit of the tablets was assessed by gamma scintigraphy. A Guar gum-based formulation has been evaluated in healthy human volunteers, with gamma scintigraphic study [101].

The imaging methods allows visualizing the location of drug release. However, these techniques must be associated with drug blood assays, monitoring of the symptoms evolution and possible studies of the effect of the formulations on colonic bacterial flora.

V. Conclusion

Strategies used to target the drug release in colon are diverse but the use of bacterially degradable formulations seems to be the most specific. The methods used for testing the drug release from these forms are numerous and diverse. M.M.Patel [16] gets, in his literature review concerning the targeted release of colorectal cancer treatment, the formulations recently developed depending on the technology used: coatings pH dependent, time-dependent but mainly the sensitive to bacterial enzymes formulations. In this review, M.M.Patel described the different release test methods used. The use of colonic bacteria or colonic bacterial enzymes appear to be essential to simulate the colonic compartment and show a specificity of colon targetted drug release formulation. It is essential to integrate a bacteriological aspect (bacterial count and identification) in the galenic's researches on colonic drug release because the greatest colon feature is its specific and varied microbiota. Pharmacopeias do not describe a standard method. However homogenization practices would be able to compare test results from different release colonic drug release formulation and help the development of new medicines.

VI. References

- [1] N.-A. Peppas, « Vecteurs de médicaments innovants et “intelligents” : leurs applications pharmaceutiques », févr. 2008.
- [2] A. A. El-Bary, A. A. Aboelwafa, et I. M. Al Sharabi, « Influence of some formulation variables on the optimization of pH-dependent, colon-targeted, sustained-release mesalamine microspheres », AAPS PharmSciTech, vol. 13, no 1, p. 75-84, mars 2012.
- [3] A. Gazzaniga, A. Maroni, M. E. Sangalli, et L. Zema, « Time-controlled oral delivery systems for colon targeting », Expert Opin. Drug Deliv., vol. 3, no 5, p. 583-597, sept. 2006.
- [4] P. Liu et T. R. Krishnan, « Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation », J. Pharm. Pharmacol., vol. 51, no 2, p. 141-149, févr. 1999.
- [5] M. A. Peppercorn et P. Goldman, « The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine », J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 181, no 3, p. 555-562, juin 1972.
- [6] L. F. Siew, S.-M. Man, J. M. Newton, et A. W. Basit, « Amylose formulations for drug delivery to the colon: a comparison of two fermentation models to assess colonic targeting performance *in vitro* », Int. J. Pharm., vol. 273, no 1-2, p. 129-134, avr. 2004.
- [7] Y. Karrout, C. Neut, F. Siepmann, D. Wils, P. Ravaux, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, M. Lemdani, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Enzymatically degraded Eurylon 6 HP-PG: ethylcellulose film coatings for colon targeting in inflammatory bowel disease patients », J. Pharm. Pharmacol., vol. 62, no 12, p. 1676-1684, déc. 2010.
- [8] J. Varshosaz, J. Emami, F. Ahmadi, N. Tavakoli, M. Minaiyan, A. Fassihi, P. Mahzouni, et F. Dorkoosh, « Preparation of budesonide-dextran conjugates using glutarate spacer as a colon-targeted drug delivery system: *in vitro/in vivo* evaluation in induced ulcerative colitis », J. Drug Target., vol. 19, no 2, p. 140-153, févr. 2011.
- [9] L. Hovgaard et H. Brøndsted, « Current applications of polysaccharides in colon targeting », Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., vol. 13, no 3-4, p. 185-223, 1996.
- [10] A. Paharia, A. K. Yadav, G. Rai, S. K. Jain, S. S. Pancholi, et G. P. Agrawal, « Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting », AAPS PharmSciTech, vol. 8, no 1, p. 12, 2007.
- [11] S. Davaran, J. Hanaee, et A. Khosravi, « Release of 5-amino salicylic acid from acrylic type polymeric prodrugs designed for colon-specific drug delivery », J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 58, no 3, p. 279-287, avr. 1999.
- [12] M. Ashford et J. T. Fell, « Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration », J. Drug Target., vol. 2, no 3, p. 241-257, 1994.
- [13] G. Van den Mooter, « Colon drug delivery », Expert Opin. Drug Deliv., vol. 3, no 1, p. 111-125, déc. 2005.

- [14] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Characterization of ethylcellulose: starch-based film coatings for colon targeting », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 35, no 10, p. 1190-1200, oct. 2009.
- [15] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [16] M. M. Patel, « Getting into the colon: approaches to target colorectal cancer », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no 9, p. 1343-1350, sept. 2014.
- [17] R. Kinget, W. Kalala, L. Vervoort, et G. van den Mooter, « Colonic drug targeting », *J. Drug Target.*, vol. 6, no 2, p. 129-149, 1998.
- [18] A. Maroni, L. Zema, M. D. Del Curto, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, no 0.
- [19] M. Brunner, E. Lackner, P. S. Exler, H. C. De Fluiter, K. Kletter, M. Tschurlovits, R. Dudczak, H.-G. Eichler, et M. Müller, « 5-aminosalicylic acid release from a new controlled-release mesalazine formulation during gastrointestinal transit in healthy volunteers », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no 1, p. 137-144, janv. 2006.
- [20] A. Yarlak, L. Yen, et P. Hodgkins, « The relationship among multiple patient-reported outcomes measures for patients with ulcerative colitis receiving treatment with MMX(®) formulated delayed-release mesalamine », *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.*, sept. 2014.
- [21] S. P. L. Travis, E. F. Stange, M. Lémann, T. Oresland, Y. Chowers, A. Forbes, G. D'Haens, G. Kitis, A. Cortot, C. Prantera, P. Marteau, J.-F. Colombel, P. Gionchetti, Y. Bouhnik, E. Tiret, J. Kroesen, M. Starlinger, N. J. Mortensen, et European Crohn's and Colitis Organisation, « European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management », *Gut*, vol. 55 Suppl 1, p. i16-35, mars 2006.
- [22] M. Y. Hu et M. A. Peppercorn, « MMX mesalamine: a novel high-dose, once-daily 5-aminosalicylate formulation for the treatment of ulcerative colitis », *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 9, no 6, p. 1049-1058, avr. 2008.
- [23] L. P. H. Yang et P. L. McCormack, « MMX® Mesalazine », *Drugs*, vol. 71, no 2, p. 221-235, janv. 2011.
- [24] M. Xu, M. Sun, H. Qiao, Q. Ping, et E. S. Elamin, « Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 165-171, juill. 2014.
- [25] A. M. J. Newton et P. Lakshmanan, « Effect of HPMC - E15 LV premium Polymer on Release Profile and Compression Characteristics of Chitosan/ Pectin Colon Targeted Mesalamine Matrix Tablets and *in vitro* Study on Effect of pH Impact on the Drug Release Profile », *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 8, no 1, p. 46-62, avr. 2014.
- [26] S. P. L. Travis, S. Danese, L. Kupcinkas, O. Alexeeva, G. D'Haens, P. R. Gibson, L. Moro, R. Jones, E. D. Ballard, J. Masure, M. Rossini, et W. J. Sandborn, « Once-daily budesonide MMX in active, mild-to-moderate ulcerative colitis: results from the randomised CORE II study », *Gut*, vol. 63, no 3, p. 433-441, mars 2014.

- [27] K. Farkas et T. Molnár, « Novel extended release budesonide formulation for treatment of ulcerative colitis », *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 15, no 1, p. 131-137, janv. 2014.
- [28] A. K. De, P. Bhattacharya, S. Datta, et A. Mukherjee, « Evaluation of *in vivo* efficacy and toxicity of prednisolone-loaded hydrogel-based drug delivery device », *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 3, no 4, p. 225-233, oct. 2013.
- [29] L. Pastorelli, S. Saibeni, L. Spina, C. Signorelli, G. Celasco, R. De Franchis, et M. Vecchi, « Oral, colonic-release low-molecular-weight heparin: an initial open study of Parnaparin-MMX for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 28, no 5, p. 581-588, sept. 2008.
- [30] A. Roda, « A new oral formulation for the release of sodium butyrate in the ileocecal region and colon », *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no 7, p. 1079, 2007.
- [31] R. Sareen, K. Nath, N. Jain, et K. L. Dhar, « Curcumin Loaded Microsponges for Colon Targeting in Inflammatory Bowel Disease: Fabrication, Optimization, and *In Vitro* and Pharmacodynamic Evaluation », *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. e340701, juill. 2014.
- [32] R. Sareen, N. Jain, A. Rajkumari, et K. L. Dhar, « pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation », *Drug Deliv.*, avr. 2014.
- [33] E. Viennois, B. Xiao, S. Ayyadurai, L. Wang, P. G. Wang, Q. Zhang, Y. Chen, et D. Merlin, « Micheliolide, a new sesquiterpene lactone that inhibits intestinal inflammation and colitis-associated cancer », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 94, no 9, p. 950-965, sept. 2014.
- [34] G. Rai, A. K. Yadav, N. K. Jain, et G. P. Agrawal, « Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon », *Drug Deliv.*, p. 1-10, mai 2014.
- [35] A. Bose, A. Elyagoby, et T. W. Wong, « Oral 5-fluorouracil colon-specific delivery through *in vivo* pellet coating for colon cancer and aberrant crypt foci treatment », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 178-186, juill. 2014.
- [36] A. Casadó, M. L. Sagristá, et M. Mora, « Formulation and *In Vitro* Characterization of Thermosensitive Liposomes for the Delivery of Irinotecan », *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no 10, p. 3127-3138, oct. 2014.
- [37] B. Ghalandari, A. Divsalar, A. A. Saboury, et K. Parivar, « The new insight into oral drug delivery system based on metal drugs in colon cancer therapy through β -lactoglobulin/oxali-palladium nanocapsules », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 140C, p. 255-265, août 2014.
- [38] P. Bhatt, N. Khatri, M. Kumar, D. Baradia, et A. Misra, « Microbeads mediated oral plasmid DNA delivery using polymethacrylate vectors: an effectual groundwork for colorectal cancer », *Drug Deliv.*, avr. 2014.
- [39] T. Plyduang, L. Lomlim, S. Yuenyongsawad, et R. Wiwattanapatapee, « Carboxymethylcellulose-tetrahydrocurcumin conjugates for colon-specific delivery of a novel anti-cancer agent, 4-amino tetrahydrocurcumin », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*

- [40] L. Jin, Y. Ding, M. Feng, et Q. Cao, « Preparation oral levofloxacin colon-specific microspheres delivery: *in vitro* and *in vivo* studies », *Drug Deliv.*, p. 1-7, juin 2014.
- [41] C. Caddeo, A. Nácher, O. Díez-Sales, M. Merino-Sanjuán, A. M. Fadda, et M. Manconi, « Chitosan–xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin », *J. Microencapsul.*, p. 1-6, juin 2014.
- [42] S. Dhaneshwar, M. Kusrkar, S. Bodhankar, et G. Bihani, « Carrier-linked mutual prodrugs of biphenylacetic acid as a promising alternative to bioprecursor fenbufen: design, kinetics, and pharmacological studies », *Inflammopharmacology*, vol. 22, no 4, p. 235-250, août 2014.
- [43] A. Mooranian, R. Negrulj, S. Mathavan, J. Martinez, J. Sciarretta, N. Chen-Tan, T. Mukkur, M. Mikov, M. Lalic-Popovic, M. Stojančević, S. Golocorbin-Kon, et H. Al-Salami, « Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics », *J. Pharm. Innov.*, vol. 9, p. 150-157, 2014.
- [44] M. M. Patel, « Colon targeting: an emerging frontier for oral insulin delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no 6, p. 731-739, juin 2013.
- [45] S. Jose, K. Dhanya, T. A. Cinu, et N. A. Aleykutty, « Multiparticulate system for colon targeted delivery of ondansetron », *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no 1, p. 58-64, janv. 2010.
- [46] G. Z. Abdullah, M. F. Abdulkarim, M. Chitneni, A. F. Mutee, O. Z. Ameer, I. M. Salman, et A. M. Noor, « Preparation and *in vitro* evaluation of mebeverine HCl colon-targeted drug delivery system », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 16, no 4, p. 331-342, avr. 2010.
- [47] H. Kim, Y. Lee, H. Yoo, J. Kim, H. Kong, J.-H. Yoon, Y. Jung, et Y. M. Kim, « Synthesis and evaluation of sulfate conjugated metronidazole as a colon-specific prodrug of metronidazole », *J. Drug Target.*, vol. 20, no 3, p. 255-263, avr. 2012.
- [48] A. Tursi, G. Brandimarte, et R. Daffinà, « Long-term treatment with mesalazine and rifaximin versus rifaximin alone for patients with recurrent attacks of acute diverticulitis of colon », *Dig. Liver Dis.*, vol. 34, no 7, p. 510-515, juill. 2002.
- [49] C. Favier, C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J. F. Colombel, et J. Mizon, « Fecal β -D-Galactosidase Production and Bifidobacteria Are Decreased in Crohn's Disease », *Dig. Dis. Sci.*, vol. 42, no 4, p. 817-822, avr. 1997.
- [50] J. Fu, B. Wei, T. Wen, M. E. V. Johansson, X. Liu, E. Bradford, K. A. Thomsson, S. McGee, L. Mansour, M. Tong, J. M. McDaniel, T. J. Sferra, J. R. Turner, H. Chen, G. C. Hansson, J. Braun, et L. Xia, « Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no 4, p. 1657-1666, avr. 2011.
- [51] P. Seksik, « Microbiote intestinale et MICI », *Gastroentérologie Clin. Biol.*, vol. 34, no 4, p. 48-55, sept. 2010.
- [52] A. Van Gossum, « Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) », *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 21, no 2, p. 81-84, juin 2007.
- [53] T. Mitsuoka, « Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. », *Biosci. Microflora*, vol. 19, no 1, p. 15-25, 2000.

- [54] S. K. Linden, P. Sutton, N. G. Karlsson, V. Korolik, et M. A. McGuckin, « Mucins in the mucosal barrier to infection », *Mucosal Immunol.*, vol. 1, no 3, p. 183-197, mars 2008.
- [55] D. Garrido, J. H. Kim, J. B. German, H. E. Raybould, et D. A. Mills, « Oligosaccharide Binding Proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Reveal a Preference for Host Glycans », *PLoS ONE*, vol. 6, no 3, p. e17315, mars 2011.
- [56] M. A. McGuckin, S. K. Lindén, P. Sutton, et T. H. Florin, « Mucin dynamics and enteric pathogens », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no 4, p. 265-278, avr. 2011.
- [57] F. Turrone, F. Bottacini, E. Foroni, I. Mulder, J.-H. Kim, A. Zomer, B. Sánchez, A. Bidossi, A. Ferrarini, V. Giubellini, M. Delledonne, B. Henrissat, P. Coutinho, M. Oggioni, G. F. Fitzgerald, D. Mills, A. Margolles, D. Kelly, D. van Sinderen, et M. Ventura, « Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no 45, p. 19514-19519, sept. 2010.
- [58] T. M. Gloster et D. J. Vocadlo, « Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no 8, p. 683-694, août 2012.
- [59] M. Derrien, M. W. J. van Passel, J. H. B. van de Bovenkamp, R. Schipper, et W. de V. and J. Dekker, « Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract », *Gut Microbes*, vol. 1, no 4, p. 254-268, août 2010.
- [60] G. Larson, P. Falk, et L. C. Hoskins, « Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. », *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no 22, p. 10790-10798, mai 1988.
- [61] P. J. Turnbaugh, F. Bäckhed, L. Fulton, et J. I. Gordon, « Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome », *Cell Host Microbe*, vol. 3, no 4, p. 213-223, avr. 2008.
- [62] H. Tilg, A. R. Moschen, et A. Kaser, « Obesity and the Microbiota », *Gastroenterology*, vol. 136, no 5, p. 1476-1483, mai 2009.
- [63] Y. Karrout, « Innovative drug delivery systems for colon targeting », Berlin, Freie Universität Berlin, Diss., 2008, 2008.
- [64] M. J. Miles, V. J. Morris, P. D. Orford, et S. G. Ring, « The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch », *Carbohydr. Res.*, vol. 135, no 2, p. 271-281, janv. 1985.
- [65] H. N. Englyst et G. T. Macfarlane, « Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria », *J. Sci. Food Agric.*, vol. 37, no 7, p. 699-706, 1986.
- [66] S. G. Ring, J. M. Gee, M. Whittam, P. Orford, et I. T. Johnson, « Resistant starch: Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility *in vitro* », *Food Chem.*, vol. 28, no 2, p. 97-109, 1988.
- [67] V. M. Leloup, P. Colonna, S. G. Ring, K. Roberts, et B. Wells, « Microstructure of amylose gels », *Carbohydr. Polym.*, vol. 18, no 3, p. 189-197, 1992.
- [68] J. . Cummings, S. Milojevic, M. Harding, W. A. Coward, G. R. Gibson, R. Louise Botham, S. G. Ring, E. P. Wraight, M. A. Stockham, M. C. Allwood, et J. M. Newton, « *In*

vivo studies of amylose- and ethylcellulose-coated [13C]glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon », *J. Controlled Release*, vol. 40, no 1-2, p. 123-131, juin 1996.

[69] A. W. Basit, « Advances in colonic drug delivery », *Drugs*, vol. 65, no 14, p. 1991-2007, 2005.

[70] J. Alias, I. Goñi, et M. Gurruchaga, « Enzymatic and anaerobic degradation of amylose based acrylic copolymers, for use as matrices for drug release », *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 92, no 4, p. 658-666, avr. 2007.

[71] B. Åberg, « Breakdown of Dextran by Human Feces », *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 5, no 1, p. 37-38, janv. 1953.

[72] S. Chopra, S. Mahdi, J. Kaur, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, et F. J. Ahmad, « Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no 8, p. 1021-1032, 2006.

[73] E. G. H. M. van den Heuvel, D. Wils, W. J. Pasman, M. Bakker, M.-H. Saniez, et A. F. M. Kardinaal, « Short-term digestive tolerance of different doses of NUTRIOSE®FB, a food dextrin, in adult men », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 58, no 7, p. 1046-1055, 2004.

[74] W. Pasman, D. Wils, M.-H. Saniez, et A. Kardinaal, « Long-term gastrointestinal tolerance of NUTRIOSE®FB in healthy men », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 60, no 8, p. 1024-1034, févr. 2006.

[75] C. Lefranc-Millot, L. Guérin-Deremaux, D. Wils, C. Neut, L. E. Miller, et M. H. Saniez-Degrave, « Impact of a Resistant Dextrin on Intestinal Ecology: How Altering the Digestive Ecosystem with NUTRIOSE®, a Soluble Fibre with Prebiotic Properties, May Be Beneficial for Health », *J. Int. Med. Res.*, vol. 40, no 1, p. 211-224, févr. 2012.

[76] G. V. den Mooter, L. Vervoort, et R. Kinget, « Characterization of Methacrylated Inulin Hydrogels Designed for Colon Targeting: *In Vitro* Release of BSA », *Pharm. Res.*, vol. 20, no 2, p. 303-307, févr. 2003.

[77] P. Seksik, L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, et J. Doré, « Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon », *Gut*, vol. 52, no 2, p. 237-242, févr. 2003.

[78] A. Swidsinski, A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, et H. Lochs, « Mucosal flora in inflammatory bowel disease », *Gastroenterology*, vol. 122, no 1, p. 44-54, janv. 2002.

[79] L. Vervoort et R. Kinget, « *In vitro* degradation by colonic bacteria of inulinHP incorporated in eudragit RS films », *Int. J. Pharm.*, vol. 129, no 1-2, p. 185-190, mars 1996.

[80] A. Akhgari, F. Farahmand, H. Afrasiabi Garekani, F. Sadeghi, et T. F. Vandamme, « Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 28, no 4, p. 307-314, juill. 2006.

[81] A. Rubinstein, R. Radai, M. Ezra, S. Pathak, et J. S. Rokem, « *In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier », *Pharm. Res.*, vol. 10, no 2, p. 258-263, févr. 1993.

- [82] A. A. Salyers, S. E. West, J. R. Vercellotti, et T. D. Wilkins, « Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 34, no 5, p. 529-533, nov. 1977.
- [83] S.-S. Yang, K.-T. Cheng, Y.-S. Lin, Y.-W. Liu, et W.-C. Hou, « Pectin hydroxamic acids exhibit antioxidant activities *in vitro* », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no 13, p. 4270-4273, juin 2004.
- [84] P. Sriamornsak, « Application of pectin in oral drug delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no 8, p. 1009-1023, mai 2011.
- [85] Z. Wakerly, J. T. Fell, D. Attwood, et D. Parkins, « Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery », *Pharm. Res.*, vol. 13, no 8, p. 1210-1212, août 1996.
- [86] I. S. Ahmed, « Effect of simulated gastrointestinal conditions on drug release from pectin/ethylcellulose as film coating for drug delivery to the colon », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 31, no 4-5, p. 465-470, mai 2005.
- [87] O. Munjeri, P. Hodza, E. E. Osim, et C. T. Musabayane, « An investigation into the suitability of amidated pectin hydrogel beads as a delivery matrix for chloroquine », *J. Pharm. Sci.*, vol. 87, no 8, p. 905-908, août 1998.
- [88] G. S. Macleod, J. T. Fell, J. H. Collett, H. L. Sharma, et A. M. Smith, « Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropyl methylcellulose film coated tablets », *Int. J. Pharm.*, vol. 187, no 2, p. 251-257, oct. 1999.
- [89] M. Orlu, E. Cevher, et A. Araman, « Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges », *Int. J. Pharm.*, vol. 318, no 1-2, p. 103-117, août 2006.
- [90] W. Zhang, K. M. Mahuta, B. A. Mikulski, J. N. Harvestine, J. Z. Crouse, J. C. Lee, M. G. Kaltchev, et C. S. Tritt, « Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery », *Pharm. Dev. Technol.*, p. 1-4, sept. 2014.
- [91] R. Hejazi et M. Amiji, « Chitosan-based gastrointestinal delivery systems », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 89, no 2, p. 151-165, avr. 2003.
- [92] L. Illum, « Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 9, p. 1326-1331, sept. 1998.
- [93] H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, et S. Muranishi, « Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon », *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no 9, p. 1016-1021, sept. 1997.
- [94] M. K. Chourasia et S. K. Jain, « Design and development of multiparticulate system for targeted drug delivery to colon », *Drug Deliv.*, vol. 11, no 3, p. 201-207, juin 2004.
- [95] H. Tozaki, Y. Emi, E. Horisaka, T. Fujita, A. Yamamoto, et S. Muranishi, « Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: implications in peptide delivery to the colon », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 49, no 2, p. 164-168, févr. 1997.

- [96] V. Ravi, Siddaramaiah, et T. M. Pramod Kumar, « Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no 5, p. 2131-2136, mai 2008.
- [97] M. Drechsler, G. Garbacz, R. Thomann, et R. Schubert, « Development and evaluation of chitosan and chitosan/Kollocoat® Smartseal 30 D film-coated tablets for colon targeting », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
- [98] S. A. Altaf, K. Yu, J. Parasrampuriah, et D. R. Friend, « Guar gum-based sustained release diltiazem », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 8, p. 1196-1201, août 1998.
- [99] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, et P. K. Sharma, « Novel prospective in colon specific drug delivery system », *Polim. Med.*, vol. 44, no 2, p. 109-118, juin 2014.
- [100] I. Gliko-Kabir, B. Yagen, A. Penhasi, et A. Rubinstein, « Low swelling, crosslinked guar and its potential use as colon-specific drug carrier », *Pharm. Res.*, vol. 15, no 7, p. 1019-1025, juill. 1998.
- [101] Y. S. Krishnaiah, S. Satyanarayana, Y. V. Rama Prasad, et S. Narasimha Rao, « Gamma scintigraphic studies on guar gum matrix tablets for colonic drug delivery in healthy human volunteers », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 55, no 2-3, p. 245-252, nov. 1998.
- [102] J. Madan, S. R. Gundala, B. Baruah, M. Nagaraju, C. Yates, T. Turner, V. Rangari, D. Hamelberg, M. D. Reid, et R. Aneja, « Cyclodextrin Complexes of Reduced Bromonoscipine in Guar Gum Microspheres Enhance Colonic Drug Delivery », *Mol. Pharm.*, nov. 2014.
- [103] S. Y. Lin et J. W. Ayres, « Calcium alginate beads as core carriers of 5-aminosalicylic acid », *Pharm. Res.*, vol. 9, no 9, p. 1128-1131, sept. 1992.
- [104] V. R. Sinha et R. Kumria, « Polysaccharides in colon-specific drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 224, no 1-2, p. 19-38, août 2001.
- [105] T. S. Nielsen, H. N. Lærke, P. K. Theil, J. F. Sørensen, M. Saarinen, S. Forssten, et K. E. Bach Knudsen, « Diets high in resistant starch and arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs », *Br. J. Nutr.*, vol. 112, no 11, p. 1837-1849, déc. 2014.
- [106] A. Sintov, N. Di-Capua, et A. Rubinstein, « Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes », *Biomaterials*, vol. 16, no 6, p. 473-478, 1995.
- [107] P. Nykänen, S. Lempää, M. L. Aaltonen, H. Jürjenson, P. Veski, et M. Marvola, « Citric acid as excipient in multiple-unit enteric-coated tablets for targeting drugs on the colon », *Int. J. Pharm.*, vol. 229, no 1-2, p. 155-162, oct. 2001.
- [108] C. A. Kumar Varma, S. G. Panpalia, et K. J. Kumar, « Physicochemical and release characteristics of acetylated Indian palmyrah retrograded shoot starch », *Int. J. Biol. Macromol.*, mai 2014.
- [109] B.-B. Huang, G.-F. Li, J.-H. Luo, L. Duan, K. Nobuaki, et Y. Akira, « Permeabilities of rebamipide via rat intestinal membranes and its colon specific delivery using chitosan capsule as a carrier », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 14, no 31, p. 4928-4937, août 2008.

- [110] M. Z. Khan, H. P. Stedul, et N. Kurjaković, « A pH-dependent colon-targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. II. Manipulation of drug release using Eudragit L100 and Eudragit S100 combinations », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 26, no 5, p. 549-554, mai 2000.
- [111] J. Alvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, M. L. González-Rodríguez, M. Cirri, et P. Mura, « Development of enteric-coated timed-release matrix tablets for colon targeting », *J. Drug Target.*, vol. 12, no 9-10, p. 607-612, 2004.
- [112] M. Z. Khan, Z. Prebeg, et N. Kurjaković, « A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation Of drug release using Eudragit L100-55 and Eudragit S100 combinations », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 58, no 2, p. 215-222, mars 1999.
- [113] M. E. Sangalli, A. Maroni, L. Zema, C. Buseti, F. Giordano, et A. Gazzaniga, « *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral system for time and/or site-specific drug delivery », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 73, no 1, p. 103-110, mai 2001.
- [114] O. Munjeri, J. H. Collett, J. T. Fell, H. L. Sharma, et A. M. Smith, « *In vivo* behavior of hydrogel beads based on amidated pectins », *Drug Deliv.*, vol. 5, no 4, p. 239-241, 1998.
- [115] E. Fukui, N. Miyamura, K. Uemura, et M. Kobayashi, « Preparation of enteric coated timed-release press-coated tablets and evaluation of their function by *in vitro* and *in vivo* tests for colon targeting », *Int. J. Pharm.*, vol. 204, no 1-2, p. 7-15, août 2000.
- [116] H. Wei, D. Qing, C. De-Ying, X. Bai, et F. Li-Fang, « In-vitro and in-vivo studies of pectin/ethylcellulosefilm-coated pellets of 5-fluorouracil for colonic targeting », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 60, no 1, p. 35-44, janv. 2008.
- [117] S. J. Kshirsagar, M. R. Bhalekar, et R. R. Umap, « Design, development and *in vitro-in vivo* study of a colon-specific fast disintegrating tablet », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 16, no 5, p. 449-456, oct. 2011.
- [118] Y. S. Krishnaiah, P. Veer Raju, B. Dinesh Kumar, P. Bhaskar, et V. Satyanarayana, « Development of colon targeted drug delivery systems for mebendazole », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 77, no 1-2, p. 87-95, nov. 2001.
- [119] Y. S. R. Krishnaiah, V. Satyanarayana, B. Dinesh Kumar, et R. S. Karthikeyan, « *In vitro* drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil », *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 16, no 3, p. 185-192, août 2002.
- [120] I. El-Gibaly, « Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 232, no 1-2, p. 199-211, janv. 2002.
- [121] Y. Karrou, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann, L. Deremaux, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « Colon targeting with bacteria-sensitive films adapted to the disease state », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 73, no 1, p. 74-81, sept. 2009.
- [122] M. Rodríguez, J. L. Vila-Jato, et D. Torres, « Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region », *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 55, no 1, p. 67-77, oct. 1998.

- [123] Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, « Monography 2.9.3.- Essai de dissolution des formes solides. », in Pharmacopée Européenne 7.3, 2013.
- [124] H. Wei, F. Li-Fang, B. Min, C. Yong-Zhen, X. Bai, D. Qing, W. Feng, Q. Min, et C. De-Ying, « Chitosan/Kollicoat SR 30D film-coated pellets of aminosalicylates for colonic drug delivery », *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no 1, p. 186-195, janv. 2010.
- [125] H. Zhang, I. A. Alsarra, et S. H. Neau, « An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon », *Int. J. Pharm.*, vol. 239, no 1-2, p. 197-205, juin 2002.
- [126] H. Liu, X.-G. Yang, S.-F. Nie, L.-L. Wei, L.-L. Zhou, H. Liu, R. Tang, et W.-S. Pan, « Chitosan-based controlled porosity osmotic pump for colon-specific delivery system: Screening of formulation variables and *in vitro* investigation », *Int. J. Pharm.*, vol. 332, no 1-2, p. 115-124, mars 2007.
- [127] J. R. Amrutkar et S. G. Gattani, « Chitosan-chondroitin sulfate based matrix tablets for colon specific delivery of indomethacin », *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no 2, p. 670-677, 2009.
- [128] O. A. Odeku et J. T. Fell, « In-vitro evaluation of khaya and albizia gums as compression coatings for drug targeting to the colon », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 57, no 2, p. 163-168, févr. 2005.
- [129] A. Vaidya, A. Jain, P. Khare, R. K. Agrawal, et S. K. Jain, « Metronidazole loaded pectin microspheres for colon targeting », *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no 11, p. 4229-4236, nov. 2009.
- [130] Y. V. R. Prasad, Y. S. R. Krishnaiah, et S. Satyanarayana, « *In vitro* evaluation of guar gum as a carrier for colon-specific drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 51, no 2-3, p. 281-287, févr. 1998.
- [131] Y. Dong, Z. Zhou, H. Ding, et S. Zhang, « Preparation and properties of a pH sensitive carrier based on three kinds of polymer blend to control the release of 5-amino salicylic acid », *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 19, no 8, p. 960-967, déc. 2014.
- [132] M. Xu, M. Sun, H. Qiao, Q. Ping, et E. S. Elamin, « Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid », *Int. J. Pharm.*, vol. 468, no 1-2, p. 165-171, juill. 2014.
- [133] N. K. Thakral, A. R. Ray, D. Bar-Shalom, A. H. Eriksson, et D. K. Majumdar, « The quest for targeted delivery in colon cancer: mucoadhesive valdecoxib microspheres », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, p. 1057-1068, 2011.
- [134] H. Onishi, T. Oosegi, Y. Machida, et J. W. McGinity, « Eudragit coating of chitosan-prednisolone conjugate microspheres and *in vitro* evaluation of coated microspheres », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no 8, p. 848-854, août 2007.
- [135] K. L. Shantha, P. Ravichandran, et K. P. Rao, « Azo polymeric hydrogels for colon targeted drug delivery », *Biomaterials*, vol. 16, no 17, p. 1313-1318, 1995.
- [136] A. K. Singh et K. Pathak, « Colon specific CODES based Piroxicam tablet for colon targeting: statistical optimization, *in vivo* roentgenography and stability assessment », *Pharm. Dev. Technol.*, p. 1-9, nov. 2013.

- [137] P. J. Wilson et A. W. Basit, « Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: An *in vitro* study using amylose coated tablets », *Int. J. Pharm.*, vol. 300, no 1-2, p. 89-94, août 2005.
- [138] A. Elyagoby, N. Layas, et T. W. Wong, « Colon-specific delivery of 5-fluorouracil from zinc pectinate pellets through In Situ intracapsular ethylcellulose–pectin plug formation », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no 2, p. 604–616, 2013.
- [139] F. Maestrelli, M. Cirri, G. Corti, N. Mennini, et P. Mura, « Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 69, no 2, p. 508-518, juin 2008.
- [140] A. Akhgari, M. Abbaspour, et M. Moradkhanizadeh, « Combination of Pectin and Eudargit RS and Eudragit RL in the Matrix of Pellets Prepared by Extrusion-Spheronization for Possible Colonic Delivery of 5-Amino Salicylic Acid », *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 8, no 2, p. 86-92, 2013.
- [141] Y. S. R. Krishnaiah, P. R. Bhaskar Reddy, V. Satyanarayana, et R. S. Karthikeyan, « Studies on the development of oral colon targeted drug delivery systems for metronidazole in the treatment of amoebiasis », *Int. J. Pharm.*, vol. 236, no 1-2, p. 43-55, avr. 2002.
- [142] J. Varshosaz, J. Emami, N. Tavakoli, M. Minaiyan, N. Rahmani, F. Dorkoosh, et P. Mahzouni, « Development of novel budesonide pellets based on CODES(TM) technology: *In vitro/in vivo* evaluation in induced colitis in rats », *Daru J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.*, vol. 19, no 2, p. 107-117, 2011.
- [143] A. Rubinstein, D. Nakar, et A. Sintov, « Colonic Drug Delivery: Enhanced Release of Indomethacin from Cross-Linked Chondroitin Matrix in Rat Cecal Content », *Pharm. Res.*, vol. 9, no 2, p. 276-278, févr. 1992.
- [144] M. Z. Ahmad, S. Akhter, M. Anwar, A. Singh, I. Ahmad, M. R. Ain, G. K. Jain, R. K. Khar, et F. J. Ahmad, « Feasibility of Assam Bora rice starch as a compression coat of 5-fluorouracil core tablet for colorectal cancer », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 9, no 1, p. 105-110, janv. 2012.
- [145] S. S. Dhaneshwar, M. Chail, M. Patil, S. Naqvi, et G. Vadnerkar, « Colon-specific mutual amide prodrugs of 4-aminosalicylic acid for their mitigating effect on experimental colitis in rats », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no 1, p. 131-142, janv. 2009.
- [146] A. W. Basit, M. D. Short, et E. L. McConnell, « Microbiota-triggered colonic delivery: Robustness of the polysaccharide approach in the fed state in man », *J. Drug Target.*, vol. 17, no 1, p. 64-71, janv. 2009.
- [147] R. Sharma, R. K. Rawal, T. Gaba, N. Singla, M. Malhotra, S. Matharoo, et T. R. Bhardwaj, « Design, synthesis and ex vivo evaluation of colon-specific azo based prodrugs of anticancer agents », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no 19, p. 5332-5338, oct. 2013.
- [148] V. Araujo, A. Gamboa, N. Caro, L. Abugoch, M. Gotteland, F. Valenzuela, H. A. Merchant, A. W. Basit, et C. Tapia, « Release of prednisolone and inulin from a new calcium-alginate chitosan-coated matrix system for colonic delivery », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no 8, p. 2748-2759, août 2013.
- [149] C. Tannergren, A. Borde, C. Boreström, B. Abrahamsson, et A. Lindahl, « Evaluation of an *in vitro* faecal degradation method for early assessment of the impact of

- colonic degradation on colonic absorption in humans », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 57, p. 200-206, juin 2014.
- [150] S. D. Siciliano, B. D. Laird, et C. L. Lemieux, « Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands », *Chemosphere*, vol. 80, no 9, p. 1101-1108, août 2010.
- [151] P. Allsopp, S. Possemiers, D. Campbell, I. S. Oyarzábal, C. Gill, et I. Rowland, « An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity », *Anaerobe*, vol. 22, p. 38-44, août 2013.
- [152] S. Worametrachanon, A. Apichartsrangkoon, P. Chaikham, P. Van den Abbeele, T. Van de Wiele, et T. I. Wirjantoro, « Effect of encapsulated *Lactobacillus casei* 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no 11, p. 5241-5250, juin 2014.
- [153] M. Ouethrani, T. Van de Wiele, E. Verbeke, A. Bruneau, M. Carvalho, S. Rabot, et V. Camel, « Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon », *Food Chem.*, vol. 141, no 4, p. 3291-3300, déc. 2013.
- [154] W. M. Brück, G. Graverholt, et G. R. Gibson, « Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria », *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 41, no 3, p. 231-237, sept. 2002.
- [155] E. Barroso, T. Van de Wiele, A. Jiménez-Girón, I. Muñoz-González, P. J. Martín-Alvarez, M. V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé, C. Peláez, M. C. Martínez-Cuesta, et T. Requena, « *Lactobacillus plantarum* IFPL935 impacts colonic metabolism in a simulator of the human gut microbiota during feeding with red wine polyphenols », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, avr. 2014.
- [156] A. Jain, Y. Gupta, et S. K. Jain, « Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon », *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.*, vol. 10, no 1, p. 86-128, 2007.
- [157] K. Mladenovska, O. Cruaud, P. Richomme, E. Belamie, R. S. Raicki, M.-C. Venier-Julienne, E. Popovski, J. P. Benoit, et K. Goracinova, « 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization », *Int. J. Pharm.*, vol. 345, no 1-2, p. 59-69, déc. 2007.
- [158] K. Mladenovska, R. S. Raicki, E. I. Janevik, T. Ristoski, M. J. Pavlova, Z. Kavrakovski, M. G. Dodov, et K. Goracinova, « Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles », *Int. J. Pharm.*, vol. 342, no 1-2, p. 124-136, sept. 2007.
- [159] Y. Karrout, L. Dubuquoy, C. Piveteau, F. Siepmann, E. Moussa, D. Wils, T. Beghyn, C. Neut, M.-P. Flament, L. Guerin-Deremaux, L. Dubreuil, B. Deprez, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « *In vivo* efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy », *J. Controlled Release*, vol. 197, p. 121-130, janv. 2015.
- [160] S. M. Al-Saidan, Y. S. R. Krishnaiah, V. Satyanarayana, et G. S. Rao, « *In vitro* and *in vivo* evaluation of guar gum-based matrix tablets of rofecoxib for colonic drug delivery », *Curr. Drug Deliv.*, vol. 2, no 2, p. 155-163, avr. 2005.
- [161] R. M. J. Palmer, M. Newton, A. Basit, et J. Bloor, « Colonic release composition ».

- [162] S. B. Hanauer et M. Sparrow, « COLAL-PRED Alizyme », *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000, vol. 5, no 11, p. 1192-1197, nov. 2004.
- [163] C. J. Kenyon, R. V. Nardi, D. Wong, G. Hooper, I. R. Wilding, et D. R. Friend, « Colonic delivery of dexamethasone: a pharmacoscintigraphic evaluation », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 11, no 1, p. 205-213, févr. 1997.
- [164] L. A. Hodges, K. A. Sime, L. A. Creech, S. M. Connolly, S. T. Barclay, M. C. Kwon, B. J. Jeon, S. M. Shim, H. S. Wang, H. N. E. Stevens, et J. S. Park, « Pharmacoscintigraphy confirms consistent tamsulosin release from a novel triple-layered tablet », *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no 1, p. 41-46, sept. 2013.

Annexe 2:

**Is the microbially-triggered
colon –targeting strategy still
efficient in patients treated by
antibiotics?**

I. Introduction

Especially in chronic diseases such as chronic inflammatory bowel disease (IBD), the patient's compliance to follow a lifelong treatment is important [1], [2]. The available medications for these pathologies are administered rectally, orally or by injection [3]. In an environment where individualized and targeted therapies are of interest, dosage forms are developed, which deliver the drug as close as possible to the target site. Thus, Colon targeted release aim intestinal disorders such as IBD [4], colorectal cancer [5], or constipation. This strategy is used to orally administer the dosage form in order to obtain localized colonic effects, especially when rectally inaccessible locations need to be reached. Finally, the doses of targeted dosage forms are adapted and lead to an increased effectiveness and a decreased risk of adverse events (AE) associated with systemic premature release.

Colonic release is achieved by pharmaceutical formulation technics which minimize the drug release during the transit in the upper gastrointestinal tract (UGIT: stomach and small intestine) and followed by free-set in the colon. Many strategies exist to drive the dosage forms unaffectedly into the colon, by using specific physico-chemical parameters of the different gastrointestinal compartments [6]. However, the approach of applying coatings which are sensitive towards bacterial enzymes seems to be the most specific. These coatings are usually composed by natural or modified polysaccharides [7] (indigestible by human digestive enzymes) fermented by colonic bacteria.

The development of new therapies for colonic drug release is slow and there are only few products on the market. In order to test their release, it is necessary to simulate each gastrointestinal compartment, therefore different methods, more or less close to the physiological conditions [8], are already in use, however, no standard is yet validated. Y. Karrout et al. have studied three commercialized products (Pentasa®, Asacol® and Lialda®), and have shown a significant drug release on the UGIT (more than 50% in the stomach for Pentasa® and more than 50% in the small intestine for Asacol®). The Lialda®, contrary to the others, releases drug neither in the UGIT (less than 10%) nor when the formulation is put in contact with a culture medium inoculated with feces of patients [9].

In this study, we have conducted a screening of polysaccharides that may have an interest in the development of new colon targeted dosage forms. A first selection was made in media simulating the UGIT and following drug release. Promising formulations with a low level of premature drug release were then tested in simulated colonic fluid consisting of culture medium inoculated with IBD patient's feces treated with antibiotics or not and a

selection according to their rate of colonic release was performed. The two best formulations selected were tested with multiple fecal samples from patients in order to show the reproducibility of the release test implementing these conditions simulating an inflamed colon. Statistical tests were performed in order to compare the release of the two formulations but also the drug release rates obtained with the feces of patients which are treated or not with antibiotics. During the dissolution test under colonic conditions, bacterial growth has been studied in order to check the effect of the polysaccharides-coating composition on the colonic microbiota. Also, some bacteria in feces samples from patients have been isolated and tested individually or in bacterial mixtures to study the possibility to use a bacterial mixture as substitute of fresh fecal sample from patients to test colonic drug release from new targeted colonic release formulation.

II. Materials and methods

1) Materials

5-Aminosalicylic acid (5-ASA; Sigma–Aldrich, Isle d’Abeau Chesnes, France); Inulin (BENEO GmbH, Mannheim – Germany); Actistar (C-Actistar 11700, tapioca maltodextrin, Cargill, Haubourdin, France); PenFibeRS (food grade modified resistant potato starch, Penford Food Ingredients Co, Centennial, United States); CPharmGel (CPharmGel 03302, pregelatinized maize starch, Cargill, Haubourdin, France); microcrystalline cellulose (Avicel PH 101; FMC Biopolymer, Brussels, Belgium); bentonite and polyvinylpyrrolidone (PVP, Povidone K 30) (Cooperation Pharmaceutique Francaise, Melun, France); aqueous ethylcellulose dispersion (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymers, Brussels, Belgium); triethyl citrate (TEC, Morflex, Greensboro, USA); Columbia blood agar, extracts from beef and yeast as well as tryptone (=pancreatic digest of casein) (Becton Dickinson, Sparks, USA); l-cysteine hydrochloride hydrate (Acros Organics, Geel, Belgium); McConkey agar (BioMérieux, Balme-les-Grottes, France) cysteinated Ringer solution (Merck, Darmstadt, Germany); API 20E system (BioMérieux , La Balme -les -Grottes , France)

2) Preparation of drug-loaded pellet cores

Drug-loaded pellet cores (diameter: 710–1000 μm ; 60% 5-ASA, 32% microcrystalline cellulose, 4% bentonite, 4% PVP: Polyvinyl Pyrrolidone) were prepared by extrusion and spheronization. The powders were blended in a high-speed granulator (Lödige, Paderborn, Germany) and purified water was added until a homogeneous mass was obtained (41 g of water for 100 g of powder blend). The wetted mixture was passed through a cylinder extruder (SK M / R; Alexanderwerk, Remscheid, Germany). The extrudates were subsequently spheronized at 520 rpm (Spheronizer model 15; Calveva, Dorset, United Kingdom) and dried in a fluidized bed at 40°C for 30 min (ST 15; Aéromatic, Muttenz, Switzland). The size fraction “710–1000 μm ” was obtained by sieving [10].

3) Preparation of coated pellets

Polysaccharides were dissolved in purified water (5%, w/w). The aqueous ethylcellulose dispersion was plasticized overnight with 25 % triethyl citrate (w/w, based on the polymer mass) under magnetic stirring and diluted with the polysaccharide solution to 15% (w/w) polymer content 30 min before to coating. Polysaccharide and ethylcellulose were blend at a ratio of 1:2, 1:3, 1:4 or 1:5 (w/w, based on the non-plasticized polymer drymass). The drug-loaded pellet cores were coated in a fluidized bed coater equipped with a Wurster insert (Strea 1; Niro, Aeromatic-Fieldler, Bubendorf, Switzerland) until a weight gain of 15 and 20% (w/w) was achieved. Process parameters are as follows: the temperature of the incoming air: 39 ± 2 ° C, temperature of the coating: 39 ± 2 ° C, spray speed: 1.5 to 3 g / min, spray pressure: 1.2 bar, the diameter of spray nozzle: 1.2 mm. After coating, the beads were further fluidized for 10 min and subsequently cured in an oven for 24 h at 60 °C.

Table 1 shows the different formulations developed from 5-ASA loaded pellets and coated with a blend of polysaccharide and ethylcellulose with different ratios and varying coating levels.

Formulation Name	Polysaccharides	Ratio Polysaccharide : Ethylcellulose	Coating Level
F1	Inulin	1 : 4	20%
F2	Inulin	1 : 5	20%
F3	Actistar®	1 : 4	20%
F4	Actistar®	1 : 3	15%
F5	Actistar®	1 : 3	20%
F6	Actistar®	1 : 2	15%
F7	Actistar®	1 : 2	20%
F8	PenFiber®	1 : 4	15%
F9	PenFiber®	1 : 3	15%
F10	PenFiber®	1 : 3	20%
F11	PenFiber®	1 : 2	15%
F12	PenFiber®	1 : 2	20%
F13	CPharmGe®I	1 : 4	20%
F14	-	0 : 1	15%
F15	-	0 : 1	20%

Table 1: Formulations composition.

4) Preparation of culture medium

Culture medium was prepared by dissolving 1.5 g beef extract, 3 g yeast extract, 5 g tryptone, 2.5 g NaCl and 0.3 g l-cysteine hydrochloride in 1 L distilled water (pH 7.0±0.2) and subsequent sterilization (20 min, 115°C).

5) Fecal sample preparation

The feces were diluted 1:200 with cysteinated Ringer solution; 2.5mL of this suspension were diluted with the culture medium to give a final volume of 100mL.

The average bacteria rate at the beginning of the release test is about 10^8 CFU (Colony Forming Unit) / 100ml of culture medium for stools from patient without antibiotic and about 10^6 CFU / 100ml for stool of patient with antibiotics.

6) Patients

Feces of patients with Crohn's disease or ulcerative colitis arisen from inpatient and consultations Gastroenterology services of the Hospital Claude Huriez in the University Hospital of Lille (France). Stools of patients with and without antibiotic were collected. The combination of antibiotics used was always the same: ciprofloxacin and metronidazole. Results are divided into two groups: stools of patients with antibiotics (called "with ATB" or "ATB") and stools of patients without antibiotic (called "without ATB" or "ATB Free").

Specifications of patients have been collected in their patient record such as:

- Their sex
- Their disease (Crohn's disease "CD" or Ulcerative Colitis "UC")
- Their age at sample
- Their age at diagnosis
- Information whether patients were hospitalized or in consultation service on the day of sample collection.
- Information whether patients were smokers or not the day of sample collection
- Information whether patients have an antecedent tobacco dependence
- Information whether patients have undergone intestinal surgery with resection or not.
- Information on the evolution of Crohn's disease:
 - Patients were classified according to the Harvey Bradshaw score [11]:
 - Patients in remission: Harvey Bradshaw score < 5
 - Patients with "mild active disease": Harvey Bradshaw score = 5-7
 - Patients with "severe active disease": Harvey Bradshaw score = 8-16
 - Patients were classified according to the Montreal score [12], [13]:
 - For lesions locations:
 - Ileal lesions: Montreal score = L1
 - Colonic lesions: Montreal score = L2
 - Ileocolonic lesions: Montreal score = L3
 - For lesions behaviours:
 - Non stricturing and non penetrating lesions: Montreal score = B1
 - Stricturing lesions: Montreal score = B2
 - Penetrating lesions: Montreal score = B3
- Information on the evolution of ulcerative colitis:

Patients were classified according endoscopic scores: the Mayo [14] and the UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) [15], [16] scores, in two grades:

- Patients in remission
- Patients with active disease

7) Drug release studies

a) Release test in the upper gastrointestinal tract (UGIT)

Drug release from pellets was measured in 0.1 M HCl during 2 h, followed by phosphate buffer pH 7.4 (USP 38) during 6 h using the USP Apparatus 3 (Bio-Dis; Varian, Paris, France) (total volume 200 mL; 37 °C, 10 rpm and 5 rpm; n=3). At pre-determined time intervals, 3 mL samples were withdrawn and 5-ASA content was analyzed UV-spectrophotometrically at $\lambda=303$ nm for HCl samples and $\lambda=330$ nm for PBS samples (Anthelie Advanced, Secomam, Domont, France).

b) Release test in colonic conditions

Drug release from pellets was measured, after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating condition (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) using the USP Apparatus 3 (Bio-Dis; Varian, Paris, France) (total volume 200 mL; 37 °C, 10 rpm and 5 rpm), in 120 mL glass bottles (diameter: 4.5 cm, height: 10 cm) filled with 100 mL culture medium inoculated with feces from inflammatory bowel disease patients (50 rpm, 37 °C, under anaerobic conditions (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂ in an anaerobic chamber Don Whitley Scientific, United Kingdom), n=3. At pre-determined time points, 3 mL samples were withdrawn, centrifuged at 15,000 rpm for 10 min, filtered (0.22 μ m) for sterilization and analysed for drug content using with High Performance Liquid Chromatography (HPLC; ProStar 230; Varian) with UV/Vis detection and a C18 column (Varian, Pursuit 5 μ m, C18, 250 x 4.6 mm). The HPLC system was equipped with the Galaxie® Chromatography software (Varian).

The mobile phase used was a filtered mixture of 10% methanol and 90% of an aqueous acetic acid solution (1%, w/v). Process parameters are as follows: mobile phase

flow rate: 0.5 ml/min; detection UV detector $\lambda=300$, injection volume = 50 μL , 5-ASA retention time = 7.5 min.

8) Bacteriological analysis

Bacterial counts were performed on fecal samples at the beginning and the end of the drug release test in colonic conditions. A bacterial identification of predominant bacteria initially present in the fecal samples was implemented. Counts are made by preparing eight tenfold dilutions of fecal sample in a RC solution and 0.1 ml of each dilution were plated on non-selective agar plates: blood agar (Columbia blood) [17] (for total culturable bacteria count) and McConkey agar (selective for enterobacteria). The blood agar plates were incubated for 1 week at 37°C under anaerobic conditions (5 % CO₂, 10 % H₂, 85 % N₂). The predominant colonies present on blood agar were picked up and identified on the basis of phenotypic identification criteria [17]. McConkey agar plates were incubated for 24 h at 37°C under aerobic conditions. The most numerous colonies were identified using the API 20E® system. Counts are expressed as log CFU (Colony Forming Unit) / 100 ml of medium or g of feces.

9) Statistical analysis

Boxplots were developed to study the data dispersion. The ANOVA test was performed to compare the different pharmaceutical formulations, after verification of normal distribution of data by using the Shapiro-Wilk test. These tests are performed for the difference in release rate between T10H and T68h (called "colonic release T10-T68"). The post hoc Tukey test was performed to compare one by one each formulation and to show the superiority of one over another. The Mann-Whitney test was used to compare the distribution of release values between two populations corresponding to the stool of patients with and without antibiotics. Statistical tests were performed using SPSS software, version 20.0 (IBM SPSS Statistics, IBM Corp., Somers, NY, United States).

III. Results and discussion

1) Upper gastrointestinal tract release

The 5-ASA release from coated pellets in media simulating the UGIT conditions is rather low during the first 8 hours (Figure 1), less than 10% of the total amount of active

ingredient in the formulation for most formulations. Dissolution test's conditions are the most critical. The duration of 8h seems adapted to physiological conditions in humans, however in the literature, numerous studies shorten the passage of time in phosphate buffer to 30 min or 3h [18], [19]. A longer stay can better indicate resistance to release in the UGIT.

This low release rate is due to the physiological character of polysaccharides used, as a resistant starch is a polysaccharide digested neither in the stomach nor in the small intestine. The resistant starch can be present naturally in plants with diverse structure, or formed by retrogradation when starch-rich products are cooked and subsequently cooled, or is chemically modified in order to resist to digestive enzymes (for structures are not occurring naturally) [20]. Associating a polysaccharide with ethylcellulose, the drug release increases in the UGIT compared to formulation coated only with ethylcellulose. Indeed, formulations 16 and 17 release less than 1% 5-ASA and represent the formulations releasing the least. Only 2 formulations released more than 20% of 5-ASA in 8 hours (Figure 1). The more the polysaccharides content in the ethylcellulose based coating is important, the more the drug is released (Figure 1). This can be explained by a polysaccharide solubilisation in the release medium (hydrochloric acid or phosphate buffer). Additionally, drug release decreases with increasing coating levels irrespective the polysaccharide:EC blend ratio of the coating (Figure 1). Indeed, a larger coating thickness requires more time to be solubilised than a finer one. Only one formulation (F1) released more than 20% of 5-ASA in 8 hours (Figure 1). All formulations tested, coated with a blend of polymer and resistant polysaccharides release less drug in the simulated UGIT than Asacol® and Pentasa® formulations [9] studied by Y.Karrout et. al. (60% and 85% of drug released respectively observed in the same conditions) hence the potential value of using these coatings.

Among the formulations tested, all have met the requirements of little amounts of drug release rate in the UGIT.

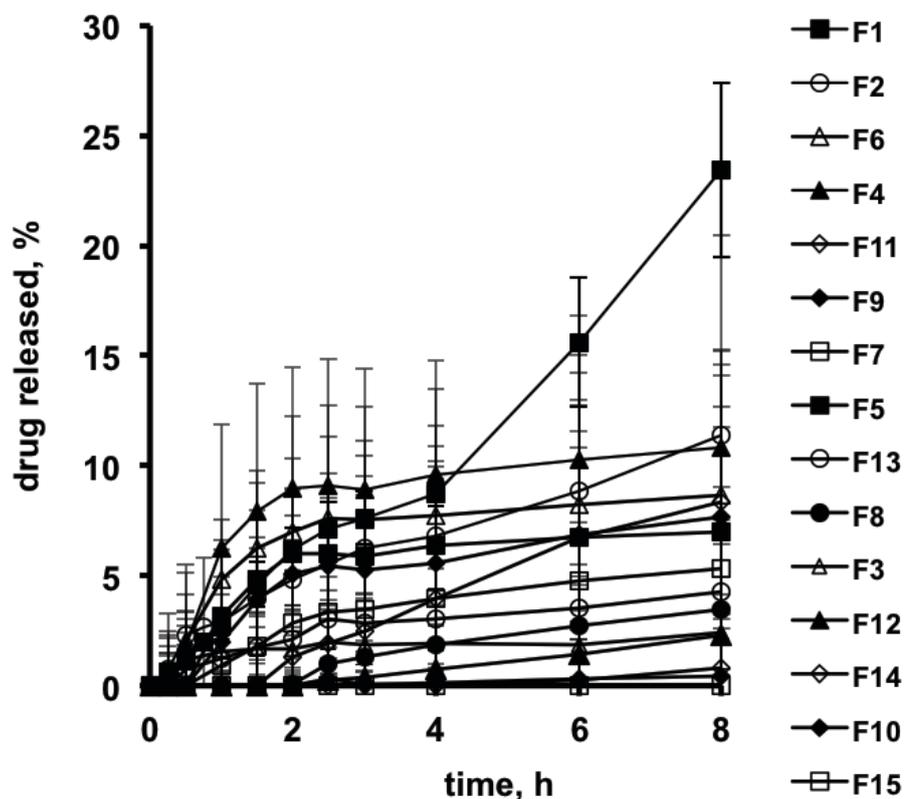


Figure 1: *In vitro* release of 5-ASA from pellets coated with different blends described in Table 1, under conditions simulating the transit through the UGIT (2h in HCl pH 1.2 and 6h in Phosphate buffer pH 7.4).

The formulations selected in order to analyze their drug release behavior under dissolution conditions simulating the colon are the formulations F1, F2, F3, F5, F6, F11 and F15. On the one hand, these formulations have a low release rate in the UGIT. On the other hand, it has been selected a limited number of formulations using polysaccharides, polysaccharide:polymer ratio and coating level different in order to compare the effect of each factors on the drug release rate in the colonic conditions:

- The formulations F1 and F2 are composed of the same polysaccharide (inulin) and coating level (20%) but not the same polymer:polysaccharide ratio (1:4 for F1 and 1:5 for F2);

- The formulations F3, F5 and F6 are composed of the same polysaccharides (Actistar®), different polymer:polysaccharide ratios (1:2 for F6; 1:3 for F5 and 1:4 for F3) and coating level (15% for F6 and 20% for F3 and F5);

- F11 formulation is dedigned with a polymer:polysaccharide ratio and a coating level already encountered in the formulation F6 (1:2 and 15%) but with a different polysaccharide (PenFiber®),

- Finally, the F15 formulation is chosen as a control of the drug release of a polysaccharide-free formulation under colonic simulating conditions.

2) Colonic release

The feces of 23 patients were studied. Table 2 shows the patients' characteristics. This population is relatively homogeneous, however the number of samples remains low. This is due to the difficulty to regularly obtain fresh fecal samples. Samples from patients with antibiotic treatment were less numerous than those from patients without ATB. This study should be continued to increase the population's size. Outpatient service provided relatively programmed samples from patients not treated with antibiotics. The combination of antibiotics used was the same for all patients treated : ciprofloxacin and metronidazole [21], [22], which targets a broad bacterial spectrum. Ciprofloxacin is active against Gram-positive, Gram-negative bacteria, and some anaerobic bacteria while Metronidazole affects only anaerobic bacteria. The population of patient included more women and over Crohn's disease as ulcerative colitis patients. However, this difference in distribution is found in both group "with" and "without antibiotics". Median age at sampling (44.65 and 40.88 years for patients treated or not with antibiotics) and median age at diagnosis (26.00 and 24.50 years respectively) are nearby the same for the two groups, although the age range is quite large (26.17 at 71.90 years for the median age at sample and 13.00 at 62.00 for the median age at diagnosis). This is an important parameter because age and anti-inflammatory's treatments are already known to have an influence on the diversity of the microbiota [23]. Inpatients are often in acute relapse and treated with antibiotics, that is why we observe a difference in distribution of samples from the two different groups (treated or not by antibiotics). Furthermore, we observe a difference between the ratio of patients having or not undergone surgery such as intestinal resection between the two groups. However, characteristics such as the presence of inflammatory attack, resection of an intestine portion or the use of antibiotics have similar bacterial effects: the reduction of the bacterial diversity in the colon.

Specifications	Total	Patients without antibiotics	Patients with antibiotic
Number of patients	23	17	6
Ratio men / women (ND for 2 patients)	6/15	5/11	1/4
Ration Crohn's disease / Ulcerative colitis (ND for 2 patients)	17/4	12/4	5/0
Median age at sampling [min; max] (ND for 2 patients)	43.68 [26.17 ; 71.90]	44.65 [26.17 ; 71.90]	40.88 [27.97 ; 54.20]
Median age at diagnosis (ND for 2 patients)	26.00 [13.00 ; 62.00]	26.00 [19.00 ; 62.00]	24.50 [13.00 ; 32.00]
Hospitalisation / Consultation ratio	11/12	5/12	6/0
Smokers at sample (ND for 2 patients)	3	3	0
Smokers antecedent (ND for 2 patients)	10	8	2
Patients having undergone a surgery consisting of intestine part resection (ND for 2 patients)	11	7	4
Ration Crohn's disease / ulcerative colitis (ND for 2 patients)	17/4	12/4	5/0
Stage of Crohn's disease			
Total	17	12	5
Disease activity			
Patients in remission	7	7	0
Patients with "mild active disease"	3	1	2
Patients with "severe active disease"	7	4	3
Disease location			
Ileal	2	2	0
Colonic	5	3	2
Ileocolonic	10	7	3
Disease features			
Non-stricturing, non-penetrating	10	7	3
Stricturing	4	3	1
Penetrating	3	2	1
Stage of Ulcerative colitis disease			
Total	4	4	0
Disease activity			
Remission	2	2	0
Active disease	2	2	0

Table 2: Patient's specifications. (ND: Not documented).

The Figure 2 shows the 5-ASA release from the F2 formulation in a sterile culture medium (without additional bacteria), following the drug release under UGIT conditions. The release is very low (less than 5% of the total amount of drug in the formulation) and represents a control of the action of the bacterial enzymes on the coating formulations. Indeed, the sterile environment is free from bacterial enzyme, thus, the drug release is probably due to the solubilisation of the coating within the dissolution medium. This release tests could not be performed for more than 8 hours because the samples were made in a non-sterile anaerobic chamber and subsequent bacterial contamination will interfere on drug release results obtained.

Inulin : Ethylcellulose Ratio 1 : 5 ; Coating Level 20%

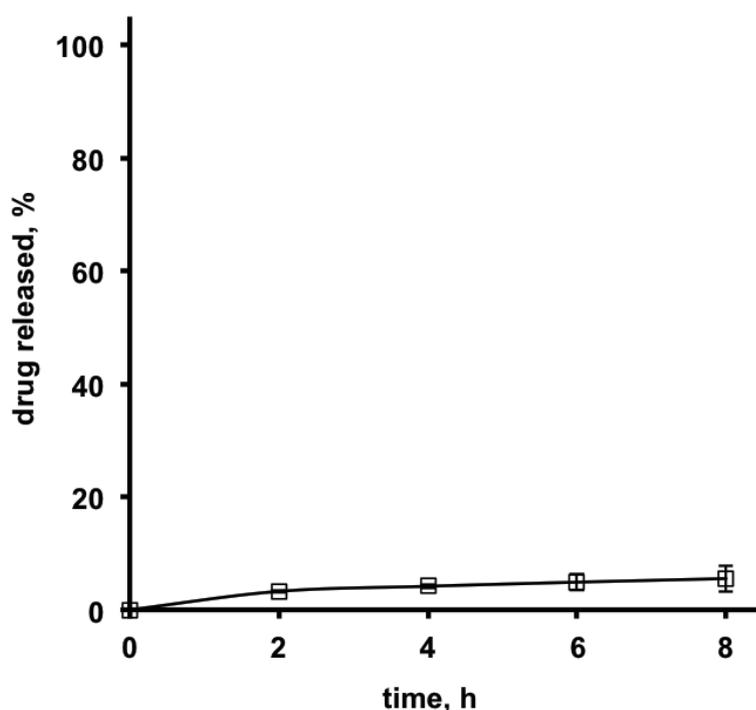


Figure 2: *In vitro* release of 5-ASA from pellets coated with aqueous dispersions of ethylcellulose with a coating level of 20% (F15), in sterile culture medium during 8h, after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) (for clarity, the step of UGIT is not shown on this figure).

Also, the 5-ASA release from the F15 formulation in a culture medium inoculated with feces of one patient who were non-treated by antibiotics, after UGIT simulation conditions shows very little drug release (Figure 3). A drug release of 4.17% of the total amount of drug present in the formulation is released indicating the lack of action of bacterial enzymes on only ethylcellulose containing dosage forms.

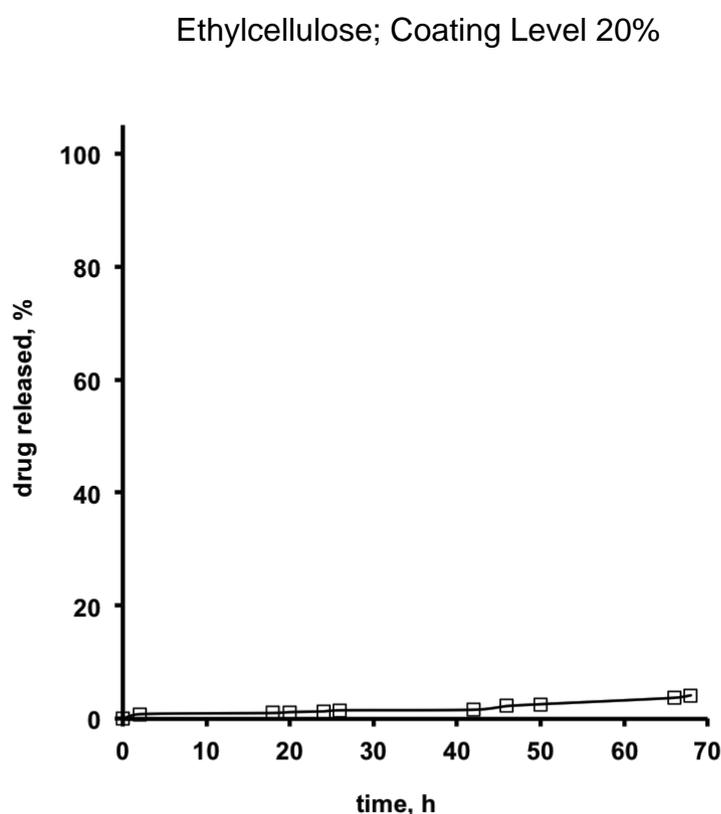


Figure 3: *In vitro* release of 5-ASA from pellets coated with 1:5 blend of Inulin and aqueous dispersions of ethylcellulose and a coating level of 20% (F2), in culture medium inoculated with a patient feces “without antibiotic” during 68h, after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) (for clarity, the step of UGIT is not shown on this figure).

Drug release in simulated colonic conditions consisting of a culture medium inoculated with feces from one patient not treated by antibiotics is represented in Figure 4. Six selected formulations with potential interest in colonic targeting are studied. F1 show a lower drug release rate than F2 which is composed with the same polysaccharide and coating level but a ratio polymer:polysaccharide different. The same can be said for formulations F3 and F5. Thus, the more the polysaccharide part in the coating is important, the more the drug is released. This phenomenon is explained by the use of polysaccharide in the coating as substrate for bacterial enzymes present in the medium. Among these six formulations, four showed low release in the simulated colonic fluid with less than or equal to 20% drug release after 68 hour of exposure (F3,F5,F6 and F11). This low release is also observed with an increased content of polysaccharide within the film coat of the pellets which can be explained by the high resistance and low availability of polysaccharides for the bacterial enzymes. Actistar is composed of retrograded amylose crystallites [24] and the other starches used are described by their suppliers as modified starches. The extent of gelatinization and retrogradation are major factors of enzymatic digestion of starches and functional properties for food processing [25]–[28]. Thus, the non-digestible feature of the starches used in the formulations of this study may either be due to their initial characters and state or to the changes in gelification and retrogradation degrees caused by the formulation steps such as heating and cooling.

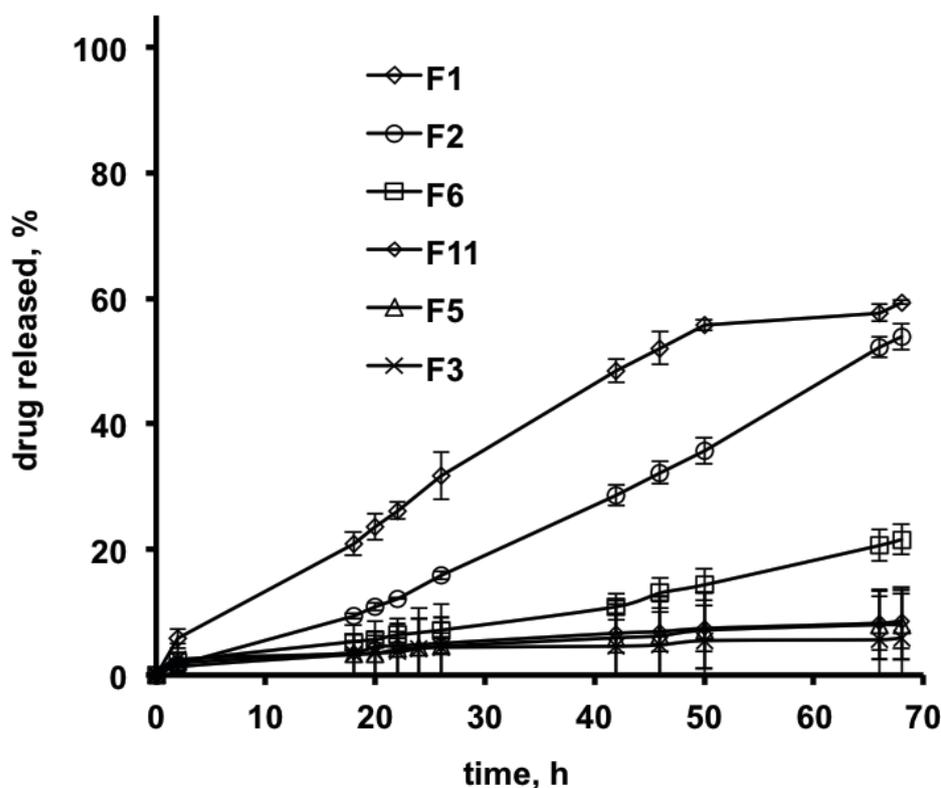


Figure 4: *In vitro* release of 5-ASA from coated pellets formulation F3, F5, F6, F11 in culture medium inoculated with one patient feces “without antibiotic” during 68h, after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) (for clarity, the step of UGIT is not shown on this figure).

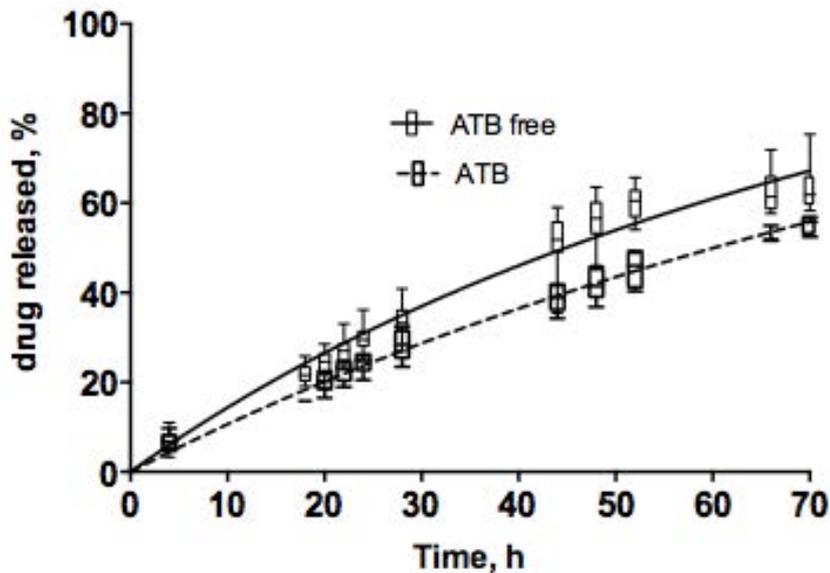
Thus, only two formulations (F1 and F2), which show the highest drug release in the simulated colonic medium (Figure 4), were selected to be tested with the feces of an IBD patient population treated or not with antibiotics.

The Figure 5 shows the *in vitro* 5-ASA release from pellets coated with formulation F1 and F2 under simulated colonic conditions employing fecal samples from inflammatory bowel disease patients optionally treated with antibiotics after a pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h).

The boxplot representation allows us to visualize the low dispersion of results and the reproducibility of the patient fresh fecal samples used. We observed a lower drug release when the feces of patient who were treated with antibiotics were used, compared to feces of patients without antibiotic treatment. The drug release from inulin-based formulations is considerable and reached almost 80% after 78 hours (F1), 20% in the simulated UGIT conditions and 60% under colonic conditions). It is widely known that the coating level

influences the drug release rate. Additionally in this study, it was observed that the ratio between the polysaccharide and ethylcellulose has a major effect on the drug release rate. Formulation F1 having a polysaccharide: ethylcellulose ratio of 1:4 is released faster than F2 having a ratio of 1:5, which is due to the higher proportion of polysaccharide available for the bacterial digestion.

Inulin : Ethylcellulose
Ratio 1 : 4 Coating Level 20%



Ratio 1 : 5 Coating Level 20%

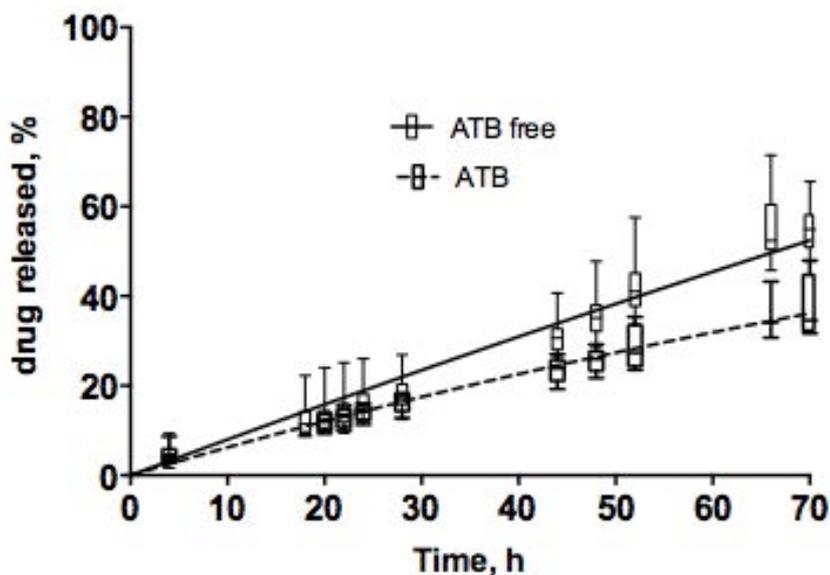


Figure 5: *In vitro* release of 5-ASA from pellets coated with ratio 1:4 (on top) and 1:5 (on bottom) blend of Inulin and aqueous dispersions of ethylcellulose and a coating level of 20%, under colonic simulating conditions with fecal samples from inflammatory bowel disease patients treated with antibiotics [ATB (dotted curve)] or not [ATB free (full curve)] during 68h after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) (for clarity, the step of UGIT is not shown on this figure). Release rates are represented as boxplots to study data dispersion.

3) Statistical analysis

Analyzing the drug release rate observed at 68 hours showed normal distribution (test Shapiro Wilk, $p > 0,05$) and the ANOVA statistical test reveals a statistically significant difference in the final release rate between the formulations coated with blend inulin:EC ratio 1:4 with a coating level of 20% and the x (F1 and F2) ($p < 0,05$). Additionally, The post-hoc Tukey test indicates that the Inulin:EC ratio 1:4 with a coating level of 20%, has a higher drug release rate at 68 hours than formulation F1.

The comparison of final drug release rate (at T78h) between the groups feces of “patients treated with antibiotic” and “antibiotic-free patients” have to be performed by non-parametric statistical tests because the number of feces is reduced and a normality in the distribution of data couldn't be found. The Mann-Whitney test shows that the drug release rate at 68 hours were significantly different from those obtained with the stools of patients with and without antibiotics ($p < 0,05$; $p = 0,013$), and tests also show the significant difference between the feces groups with and without antibiotic treatment regardless of the formulation studied (F1 or F2) ($p < 0,05$; $p = 0,001$).

In order to verify these results, we have studied the drug release rate difference according to the two formulations by separating the populations' feces between patients treated or not with antibiotics, which led to a significant release rate difference for each formulations analyzed ($p < 0,05$).

These results support the argument that the use of these formulations in patients treated with antibiotics is possible even though the drug release rate will be lower compared to patients not treated with antibiotic. These are interesting results as patients with IBD need to consume antibiotics quite often.

Enterobacteria are present in an amount underneath the threshold value of detectability when the patients were treated with antibiotics, thus a significant variation in the drug release rate was observed compared to “non treated” patients.

4) Bacterial count

In Figure 6, the bacterial count of total cultivable bacteria and enterobacteria (CFU / g of feces) present within the stools of patients treated optionally with antibiotics used in this study is shown. As expected, feces obtained from patients following an antibiotic treatment contained fewer bacteria, which proved antibiotic effect on the colonic microflora especially on enterobacteria. The count of the total cultivable bacteria was a thousand time lower for the feces from patients treated with antibiotics (10^6 CFU / g of feces) compared to the ones provided by patients without antibiotic therapy (10^9 CFU / g of feces). Concerning the enterobacteria, we see a larger difference with an amount of 10^7 CFU of enterobacteria / g of feces for patients without antibiotic therapy. These enterobacteria are not demanding bacteria, because of its optional aero-anaerobic respiratory type and its glycolytic metabolism, which give them an important role in the drug release from the coating formulations investigated.

The amount of total cultivable bacteria and Enterobacteriaceae increases during 68 hours of coated pellets exposure in the culture medium inoculated with patient feces treated or not with antibiotics (Figure 7). The total cultivable bacteria colony counts increased from 10^5 to 10^7 CFU / 100 ml between T0 and T68 hours for the patients “without antibiotic” feces and from 10^4 to 10^6 CFU / 100 ml for the patients “with antibiotics” feces . The enterobacteria colony counts increased from 10^3 to 10^7 CFU / 100 ml between T0 and T68 hours for the patients “without antibiotic” feces. The feces of patients “with antibiotics” contain very low level of enterobacteria (median counts often below the threshold counting).

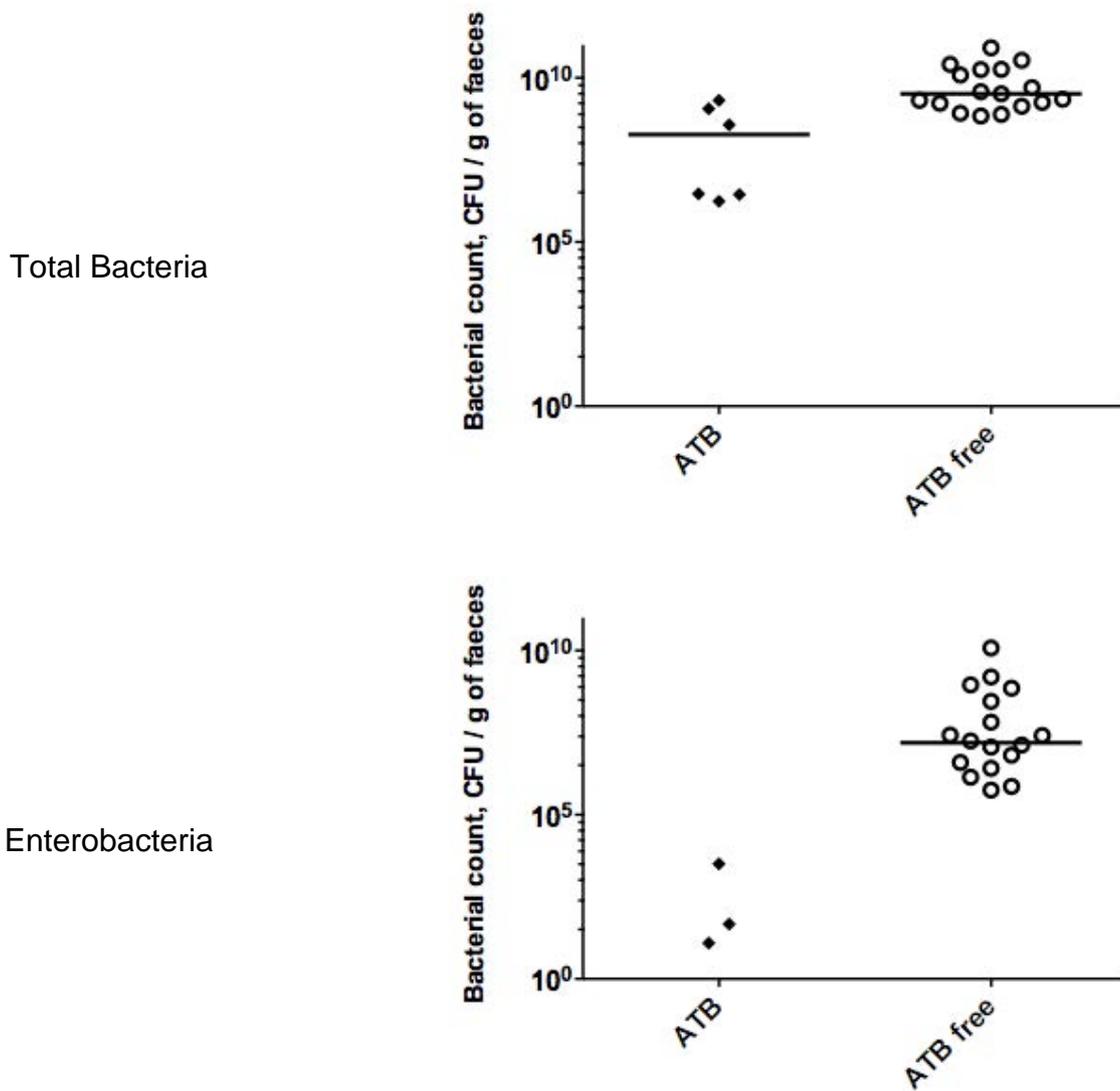


Figure 6: Bacterial count of total cultivable bacteria (top row) and Enterobacteriaceae (bottom row) present in the stools (UFC / g of feces) of patients treated by antibiotics (left hand side) or without antibiotics (right hand side).

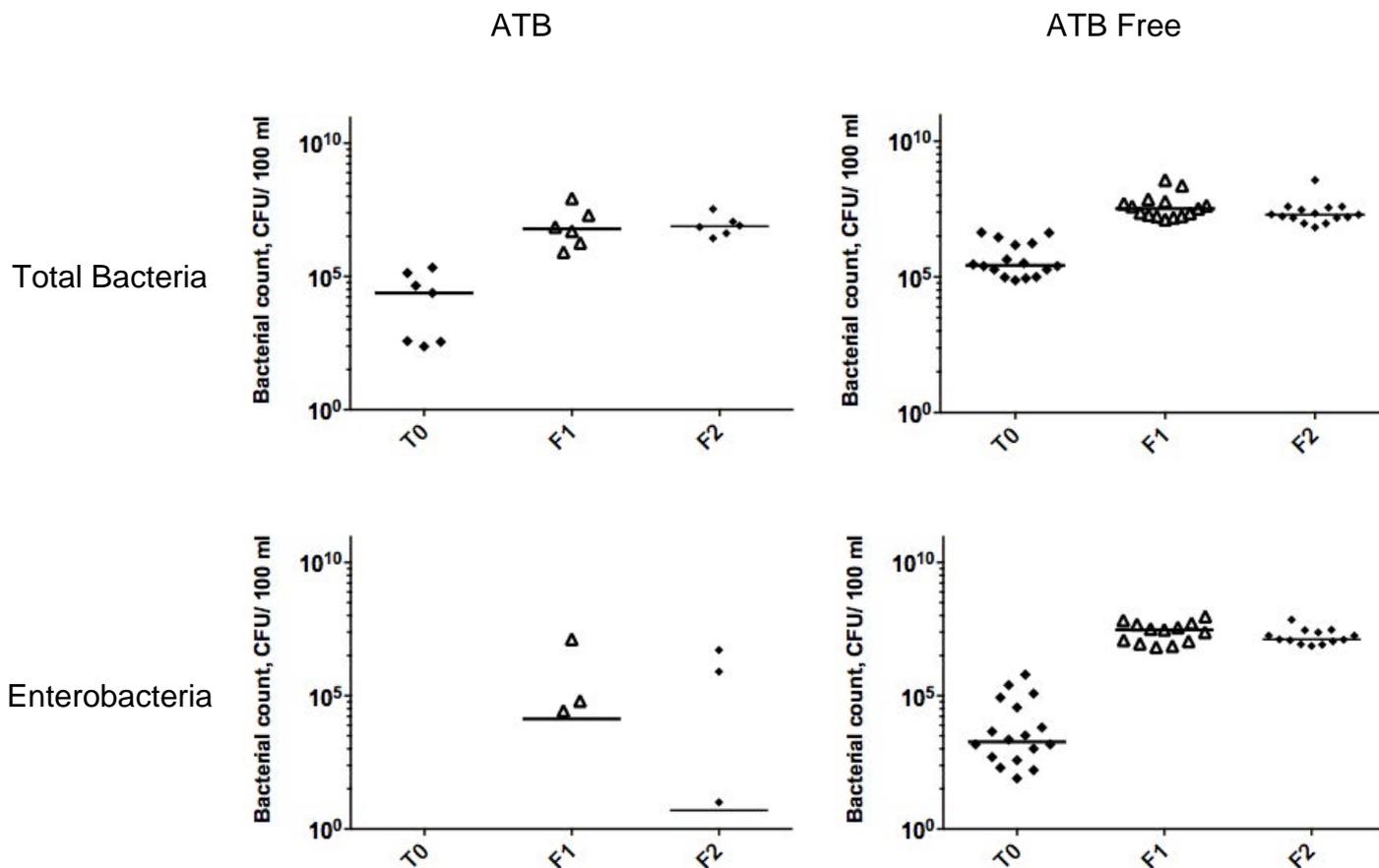


Figure 7: Bacterial count of total cultivable bacteria (top row) and Enterobacteriaceae (bottom row) present in the culture medium (UFC / 100 mL) inoculated with stools of patients treated by antibiotics (left hand side) or without antibiotics (right hand side) in early release test (T0) and at the end of the release test (68h) for formulations consisting of 5-ASA pellets coated with ratio 1:4 (F1) and 1:5 (F2) blend of Inulin and aqueous dispersions of ethylcellulose and a coating level of 20%.

The bacteria identification was performed in order to determine the type of bacteria using as substrate the polysaccharides-based coatings used in the formulations analyzed in this study. These isolated bacteria would allow developing a simple bacterial mixture and a standardized method to mimic the colonic conditions in drug release studies for microbially triggered colon targeting formulations. The bacteria of interest are therefore glycolytic, predominant in IBD patient feces and with low pathogenicity. Thus, many types of bacteria have been isolated such as *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* (for example *Bacteroides fragilis*), *Prevotella*, *Clostridium* (for example *Clostridium clostridioforme*), *Veillonella*, enterobacteria such as *Escherichia coli* and *Klebsiella* (for example *Klebsiella pneumoniae*). The identification of bacteria present in patients' feces is quite varied, and the presence of many glycolytic bacteria reinforces the approach of using bacterial enzymes as a tool for colonic drug release.

The feces of patients treated with antibiotics have a reduced bacterial diversity which is predominated by *Lactobacillus*. Yeasts, particularly *Candida albicans* were cultured from some of these feces. The analysis of fresh fecal sample from IBD patients allowed us to be the closest possible to the clinical conditions. This technique allows providing a drug release by bacteria present in the colon of patients which are targeted by these anti-inflammatory treatments. The use of fresh fecal sample from patients treated with antibiotic confirms these results. The drug release rate is lower using the feces of patients treated with antibiotics, but the release is still significant. The drug release would still be carried out when the quantity and quality of the intestinal microbiota of patients are altered by antibiotics (which is quite common with this type of disease).

Bacterial counts made at the beginning and the end of the colonic drug release test show bacterial growth during the 68 hours. Thus, despite the dilution and the lack of sugar in the culture medium, the bacteria were able to use the polysaccharide from the pellet coat as substrate. This feces and culture medium dilution shows the production inductibility of the bacterial enzyme digesting the polysaccharide-coating. The dilution avoids a saturation of the medium by bacteria. Indeed, the bacterial growth is composed of three phases: the lag phase, the exponential growth phase and the stationary phase of growth due to saturation. In a non-renewed medium as that used in our study, it is necessary to dilute the fecal sample in order to observe the behavior of bacteria during the exponential growth phase.

The use of polysaccharides-based coating as substrates for bacterial growth can also be checked by measuring the medium pH (the polysaccharides digestion by bacterial enzymes acidify the culture medium) or by measuring the gas evolution (carbon dioxide or methane, for example), but the amount of degraded polysaccharides are so low that the physico-chemical features would not be observable.

The observed bacterial growth confirm a potential prebiotic effect of the polysaccharides used. This effect would be useful to improve the noticed bacterial imbalance in the colon of IBD patients.

5) Isolated strains and mixture of strains

The Figure 8 shows the drug release curves from the formulations F1 and F2 in colonic conditions consisting on a culture medium inoculated with different bacterial mixes of strains isolated from feces of IBD patients. The mean drug release curves of formulations under colonic conditions consisting on a culture medium inoculated with entire feces of IBD patient not treated with antibiotic are represented as “drug release control”. It is observed that the curves of drug release obtained with mixtures of strains are very close to the drug release curves obtained with the whole feces, without exceeding it. The bacterial mixtures seem to be able to replace the entire fresh feces from patients in the colonic drug release study without unfortunately being able to identify a most effective mix among those already tested yet. But this method stays interesting in order to simplify the drug release test under colonic conditions and to standardize operating conditions.

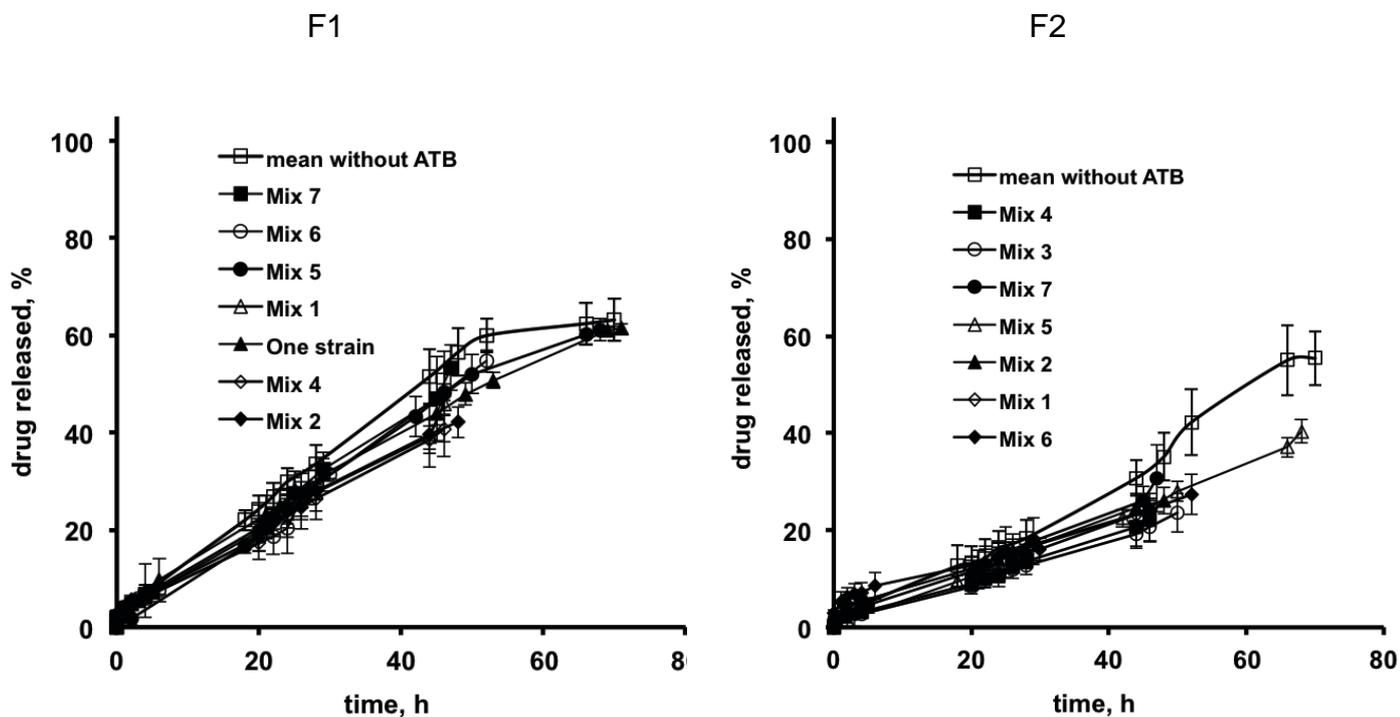


Figure 8: *In vitro* release of 5-ASA from pellets coated ratio 1:4 (F1; on top) and 1:5 (F2; on bottom) blend of inulin and aqueous dispersions of ethylcellulose with a coating level of 20%; under colonic simulated conditions consisting of culture medium inoculated by a mixture of bacterial strain isolated from fecal samples from inflammatory bowel disease patients treated or not with antibiotics (“mean without antibiotics” represent the mean 5-ASA release under colonic simulated conditions with fecal samples from inflammatory bowel disease patients not treated with antibiotics). The colonic step lasts 48h to 68h according to the mixture, after pretreatment during 10 hours in UGIT simulating conditions (in 0.1 M HCl solution pH 1.2 during 2h followed by phosphate buffer pH 7.4 during 8h) (for clarity, the step of UGIT is not shown on this figure).

Mix1: Y70-15 *Bacteroides ovatus*; 1 mL; Y71-3 *Clostridium ramosum* 1 mL Y71-4 *Clostridium innocuum* 1 mL;

Mix 2: Y63-4 *Bacteroides stercoris* 1 mL; Y52-2 *E. coli* 1 mL of dilution 10^{-1}

Mix 3: Y70-15 *Bacteroides ovatus* 1 mL; Y52-2 *E. coli* 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 4: Y70-15 *Bacteroides ovatus* 1 mL; Y52-2 *E. coli* 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 5: Y80-6 *Bifide* 1 mL; Y82-1 *E. coli* 1 mL dilution 10^{-1}

Mix 6: Y89-1 *E. coli* 1 ml dilution 10^{-1} ; Y89-2 *Bacteroides* 1 ml

Mix 7: Y90-13 *Ruminococcus* 1 ml; Y91-1 *E.Coli* 1ml dilution 10^{-1}

6) Prospects

It would be interesting to analyse the enzymes production of colonic bacteria, using a pure polysaccharide solution as substrate. This may be achieved by studying bacterial growth and medium acidification (due to the saccharide fermentation), in a culture medium implemented with the polysaccharide of interest. It would also be possible with this technique to target the bacteria strain responsible of the polysaccharide digestion in the fecal flora and thereby help developing the standardized bacterial mixture for the drug release test. The standardized mix of bacteria could eventually be used in a system mimicking dissolution in the entire GIT such as SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) [29]–[31].

The screening of polysaccharides candidates for the development of colonic targeted drug release formulations can be performed studying free films composed of polysaccharide: polymer blend. Different parameters can be measured on these films as the loss of weight, the water intake, the digestibility by fecal bacteria [32] or bacterial mixes or the drug diffusion through. Subsequently, it is possible to appreciate the drug release through films containing drug. The inconvenient of free-films use is the difficulty of correlating the films and coatings (whose thickness is extremely low) properties

It would be interesting to evaluate other polymer and plasticizer in order to optimize the formulation. Multilayer systems with drug layers could be evaluated [33]. Although these colonic drug release systems will not go toward simplification of fabrication.

The structure of the pellet-coating could be studied by different technology including SEM (scanning electron microscopy) [34], [35] or terahertz pulsed imaging [36], [37]. These would allow verifying the coating integrity prior the dissolution testing and evaluating the damages caused by bacterial enzymes on coat.

Coatings developed could be used for other formulations such as micro- or nanoparticles [38], [39]. There should also be checked their use with other drugs, combinations of drugs, lipophilic or volatile drugs.

The drug release from formulations may finally be refined by targeting the release toward a specific part of the colon based on specific microbial populations according to location.

These formulations are intended to be evaluated *in vivo* in animals and eventually in humans. Many studies have been performed in rats or mice for similar formulations. Karrout et al. prove the superiority of a microbial susceptible film coatings based on Nutriose:EC and peas starch:EC for colon targeting *in vivo*, in rat and mice models compared to Asacol® [40].

IV. Conclusions

Strategies used to target drug release from coated pellets and the methods used for analysing the drug release from these dosage forms are numerous and varied. In this work, a dissolution method to test drug release from colon targeted dosage forms was developed. The purposed technique has proven its reproducibility and discriminating character for two formulations tested, and has many advantages over other techniques used in the literature including the use of feces of IBD patients, which was for now the closest approach to mimic the flora of patients treated with these therapies.

This study allowed us to identify, among the resistant starches, inulin, which had the best colonic release when it is included in an ethylcellulose-based coating. Comparison of the drug release results obtained with feces of patients optionally treated with antibiotics, has allowed showing that these formulations may be effective even if there are co-administered antibiotics while these treatments slightly affect the final drug release rate. Finally, the study of bacterial growth during the release test is in favor of a potential polysaccharide prebiotic effect present in the formulations tested.

The pharmaceutical industry is urged to develop new pharmaceutical forms in agreement with the medical specialist's requests, with appropriate dosages and avoided undesirable effects. The development of new therapeutic options for the IBD treatment requires the development of new formulations that need to be tested in a reproducible and fast manner. The standardization of these tests would avoid biases as observed across numerous studies. The method using the feces of IBD patients that have been experienced in this study appears to be one of the most realistic methods that allows standardization. However, optimizing a bacterial mixture to standardize the dissolution method would be an effective way to accelerate the tests of these new treatments for colon targeted drug delivery.

Prospects for creating new therapeutic molecules combinations or developing new formulations based on polysaccharides are achievable relatively quickly with this new

colonic dissolution test but *in vivo* tests are still necessary in order to prove the correlation with the *in vitro* results, the efficacy and safety of these new formulations.

V. References

- [1] S. V. Kane, « Systematic review: adherence issues in the treatment of ulcerative colitis », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no 5, p. 577-585, mars 2006.
- [2] D. K. Bodger, « Cost Effectiveness of Treatments for Inflammatory Bowel Disease », *PharmacoEconomics*, vol. 29, no 5, p. 387-401, mai 2011.
- [3] C. N. Bernstein, M. Fried, J. h. Krabshuis, H. Cohen, R. Eliakim, S. Fedail, R. Gearry, K. I. Goh, S. Hamid, A. G. Khan, A. w. LeMair, Malfertheiner, Q. Ouyang, J. f. Rey, A. Sood, F. Steinwurz, O. O. Thomsen, A. Thomson, et G. Watermeyer, « World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010 », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 16, no 1, p. 112-124, janv. 2010.
- [4] B. Xiao et D. Merlin, « Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no 11, p. 1393-1407, nov. 2012.
- [5] M. M. Patel, « Getting into the colon: approaches to target colorectal cancer », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 11, no 9, p. 1343-1350, sept. 2014.
- [6] A. Maroni, M. D. Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral colon delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 372-394, déc. 2013.
- [7] M. K. Chourasia et S. K. Jain, « Polysaccharides for colon targeted drug delivery », *Drug Deliv.*, vol. 11, no 2, p. 129-148, avr. 2004.
- [8] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, et P. K. Sharma, « Novel prospective in colon specific drug delivery system », *Polim. Med.*, vol. 44, no 2, p. 109-118, juin 2014.
- [9] Y. Karrouit, C. Neut, D. Wils, F. Siepman, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepman, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [10] Y. Karrouit, C. Neut, D. Wils, F. Siepman, L. Deremaux, M.-P. Flament, L. Dubreuil, P. Desreumaux, et J. Siepman, « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no 3-4, p. 427-433, juin 2009.
- [11] W. R. Best, « Predicting the Crohn's disease activity index from the harvey-bradshaw index », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 12, no 4, p. 304-310, avr. 2006.
- [12] J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire, et J.-F. Colombel, « The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications », *Gut*, vol. 55, no 6, p. 749-753, janv. 2006.
- [13] L. M. Spekhorst, M. C. Visschedijk, R. Alberts, E. A. Festen, E.-J. van der Wouden, G. Dijkstra, et R. K. W. D. I. O. C. A. C. Icc, « Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, no 41, p. 15374-15381, nov. 2014.

- [14] J. D. Lewis, S. Chuai, L. Nessel, G. R. Lichtenstein, F. N. Aberra, et J. H. Ellenberg, « Use of the noninvasive components of the mayo score to assess clinical response in Ulcerative Colitis », *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 14, no 12, p. 1660-1666, déc. 2008.
- [15] S. P. L. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, M. Lémann, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, W. Reinisch, B. E. Sands, B. R. Yacyshyn, C. A. Bernhardt, J.-Y. Mary, et W. J. Sandborn, « Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) », *Gut*, vol. 61, no 4, p. 535-542, avr. 2012.
- [16] S. P. L. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, W. Reinisch, B. E. Sands, B. R. Yacyshyn, P. Schnell, C. A. Bernhardt, J.-Y. Mary, et W. J. Sandborn, « Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity », *Gastroenterology*, vol. 145, no 5, p. 987-995, nov. 2013.
- [17] C. Neut, P. Bulois, P. Desreumaux, J.-M. Membreé, E. Lederman, L. Gambiez, A. Cortot, P. Quandalle, H. van Kruiningen, et J.-F. Colombel, « Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 97, no 4, p. 939-946, avr. 2002.
- [18] M. D. Del Curto, A. Maroni, L. Palugan, L. Zema, A. Gazzaniga, et M. E. Sangalli, « Oral delivery system for two-pulse colonic release of protein drugs and protease inhibitor/absorption enhancer compounds », *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no 8, p. 3251-3259, 2011.
- [19] S. Klein, M. W. Rudolph, B. Skalsky, H.-U. Petereit, et J. B. Dressman, « Use of the BioDis to generate a physiologically relevant IVIVC », *J. Controlled Release*, vol. 130, no 3, p. 216-219, sept. 2008.
- [20] M. g. Sajilata, R. S. Singhal, et P. R. Kulkarni, « Resistant Starch—A Review », *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 5, no 1, p. 1-17, janv. 2006.
- [21] H. F. Hammer, « Gut microbiota and inflammatory bowel disease », *Dig. Dis. Basel Switz.*, vol. 29, no 6, p. 550-553, 2011.
- [22] K. J. Khan, T. A. Ullman, A. C. Ford, M. T. Abreu, A. Abadir, A. Abadir, J. K. Marshall, N. J. Talley, et P. Moayyedi, « Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 106, no 4, p. 661-673, avr. 2011.
- [23] H. Mäkituokko, K. Tiihonen, S. Tynkkynen, L. Paulin, et N. Rautonen, « The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition », *Br. J. Nutr.*, vol. 103, no 2, p. 227-234, janv. 2010.
- [24] J. Hasjim et J. Jane, « Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch », *J. Food Sci.*, vol. 74, no 7, p. C556-C562, sept. 2009.
- [25] S. Wang et L. Copeland, « Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review », *Food Funct.*, vol. 4, no 11, p. 1564, 2013.
- [26] P. Arranz-Martínez, K. Srikaeo, et A. L. González-Sánchez, « Effects of non-starch polysaccharides on physicochemical properties and *in vitro* starch digestibility of rice starches », *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, vol. 4, no 1, p. 6-15, juill. 2014.

- [27] R. Hoover, « The Impact of Heat-Moisture Treatment on Molecular Structures and Properties of Starches Isolated from Different Botanical Sources », *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no 9, p. 835-847, sept. 2010.
- [28] J. Singh, L. Kaur, et H. Singh, « Food microstructure and starch digestion », *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 70, p. 137-179, 2013.
- [29] S. D. Siciliano, B. D. Laird, et C. L. Lemieux, « Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands », *Chemosphere*, vol. 80, no 9, p. 1101-1108, août 2010.
- [30] P. Allsopp, S. Possemiers, D. Campbell, I. S. Oyarzábal, C. Gill, et I. Rowland, « An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity », *Anaerobe*, vol. 22, p. 38-44, août 2013.
- [31] S. Worametrachanon, A. Apichartsrangkoon, P. Chaikham, P. Van den Abbeele, T. Van de Wiele, et T. I. Wirjantoro, « Effect of encapsulated *Lactobacillus casei* 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no 11, p. 5241-5250, juin 2014.
- [32] Y. Karrout, C. Neut, D. Wils, F. Siepman, L. Deremaux, P. Desreumaux, et J. Siepman, « Characterization of ethylcellulose: starch-based film coatings for colon targeting », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 35, no 10, p. 1190-1200, oct. 2009.
- [33] B. Dekyndt, J. Verin, C. Neut, F. Siepman, et J. Siepman, « How to easily provide zero order release of freely soluble drugs from coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 478, no 1, p. 31-38, janv. 2015.
- [34] S. Muschert, F. Siepman, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no 1, p. 130-137, mai 2009.
- [35] S. Muschert, F. Siepman, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets », *J. Controlled Release*, vol. 135, no 1, p. 71-79, avr. 2009.
- [36] M. Haaser, Y. Karrout, C. Velghe, Y. Cuppok, K. C. Gordon, M. Pepper, J. Siepman, T. Rades, P. F. Taday, et C. J. Strachan, « Application of terahertz pulsed imaging to analyse film coating characteristics of sustained-release coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 521-526, déc. 2013.
- [37] L. Ho, Y. Cuppok, S. Muschert, K. C. Gordon, M. Pepper, Y. Shen, F. Siepman, J. Siepman, P. F. Taday, et T. Rades, « Effects of film coating thickness and drug layer uniformity on *in vitro* drug release from sustained-release coated pellets: A case study using terahertz pulsed imaging », *Int. J. Pharm.*, vol. 382, no 1-2, p. 151-159, déc. 2009.
- [38] Nidhi, M. Rashid, V. Kaur, S. S. Hallan, S. Sharma, et N. Mishra, « Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review », *Saudi Pharm. J.*
- [39] A. Sosnik, J. das Neves, et B. Sarmiento, « Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review », *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no 12, p. 2030-2075, déc. 2014.

[40] Y. Karrout, L. Dubuquoy, C. Piveteau, F. Siepmann, E. Moussa, D. Wils, T. Beghyn, C. Neut, M.-P. Flament, L. Guerin-Deremaux, L. Dubreuil, B. Deprez, P. Desreumaux, et J. Siepmann, « *In vivo* efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy », *J. Controlled Release*.

Annexe 3:

**How to provide zero order
release for freely soluble drugs
from coated pellets in a
relatively simple manner**

Research article

**How to Easily Provide Zero Order Release of Freely Soluble Drugs from Coated
Pellets**

B. Dekyndt,^{1,2} J. Verin,^{1,2} C. Neut,^{1,3} F. Siepmann,^{1,2} J. Siepmann^{1,2,*}

¹*University of Lille, College of Pharmacy, 3 Rue du Prof. Laguesse, 59006 Lille, France*

²*INSERM U 1008, 3 Rue du Prof. Laguesse, 59006 Lille, France*

³*INSERM U 995, 3 Rue du Prof. Laguesse, 59006 Lille, France*

**(Article published in International Journal of Pharmaceutics; Volume 478, Issue 1, 15
January 2015, Pages 31–38)**

*correspondence:

Professor Juergen Siepmann, Ph.D.

College of Pharmacy, INSERM U 1008

University of Lille

3 Rue du Professeur Laguesse

59006 Lille, France

Phone: +33-3-20964708

Fax: +33-3-20964942

juergen.siepmann@univ-lille2.fr

I. Abstract

Coated pellets offer a great potential as controlled drug delivery systems. However, constant drug release rates are difficult to achieve with this type of dosage forms if the drug is freely water-soluble. This is because diffusional mass transport generally plays a major role and with time the drug concentration within the system decreases, resulting in decreased concentration gradients, which are the driving forces for drug release. Thus, generally "curve-shaped" release profiles with monotonically decreasing slopes are observed. This type of release kinetics might be inappropriate for an efficient and safe drug treatment. Despite the great practical importance of this potentially crucial formulation challenge, surprisingly little is yet known on how to effectively address it. In this study, a novel approach is presented based on sequential layers of drug and polymer (initially free of drug) to provide a non-homogeneous initial drug distribution, combined with lag-time effects and partial initial drug diffusion towards the pellet's core. Sugar and microcrystalline cellulose beads were used as starter cores, metoprolol succinate as freely soluble drug, ethylcellulose and poly(vinyl acetate) as release rate controlling polymers. The type, number, thickness and sequence of the drug and polymer layers were varied. Interestingly, a rather simple 4 layer system (2 drug and 2 polymer layers) allowed providing about constant drug release during 8 h. Compared to previously proposed coated pellets aiming at constant release of freely water-soluble drugs based on non-homogeneous initial drug distribution, the total coating level in this study was very much reduced: to only about 20 %. Hence, the suggested formulation approach is relatively simple and can help overcoming a potentially major hurdle in practice. Its applicability has also been demonstrated for another type of drug: propranolol hydrochloride.

Keywords: film coating; zero order release; ethylcellulose; poly(vinyl acetate); pellet

II. Introduction

Polymeric film coatings offer a great potential for oral controlled drug delivery [1]. Numerous products based on coated tablets, pellets or capsules are available on the market. Importantly, the right choice of polymers, application techniques and coated substrates allows providing large ranges of long term stable drug release profiles [2]–[5]. This includes for instance pulsatile drug delivery [6], site specific drug delivery to the colon [7] and drug delivery at a constant rate (also called zero order release kinetics). The latter type of drug release profile is frequently used to compensate drug elimination out of the human body in order to provide about constant drug concentrations at the site of action.

In the case of drugs exhibiting *limited water solubility*, such constant drug release rates can for instance be provided using coated reservoir systems: The drug is located in the system's core, which is surrounded by a water-insoluble film coating. The latter is often based on a polymer and controls drug release. Once the dosage form comes into contact with aqueous body fluids, water penetrates into the system and dissolves the drug. Importantly, not all of the drug can dissolve immediately, since drug solubility is limited. Thus, dissolved and non-dissolved drug co-exist within the system's core. The dissolved drug molecules (or ions) are available for diffusion and – due to concentration gradients – diffuse through the film coating out of the dosage form. Often, this diffusional mass transport step plays a major role for the control of drug release [8], [9]. Since the dissolution of the drug is generally much more rapid than drug diffusion through the coatings, released drug molecules (or ions) are rapidly replaced by the dissolution of parts of the remaining non-dissolved drug excess. Thus, a constant concentration of dissolved drug (a saturated solution) is provided within the system as long as non-dissolved drug excess is present. If the drug concentration outside of the dosage form is negligible, this results in constant drug concentration gradients. If the film coating does not dissolve, swell, erode or otherwise change with time, also the length of the diffusion pathways and the drug's mobility in the barrier membrane remains constant, resulting in a constant drug release rate.

In contrast, if the drug is freely water-soluble (or if the initial drug loading is sufficiently low), *all* of the drug is rapidly dissolved upon water penetration into the system. Hence, released drug molecules (or ions) are not replaced and the drug concentration inside the dosage form decreases with time. This leads to drug release rates, which decrease with time. Different approaches have been suggested to overcome this challenge [10]–[15]. Most of them refer to matrix systems [such as multi-layered tablets [16]–[19]], osmotic pumps

[20] and/or devices with special geometry, e.g., hemispheres with a central orifice [21], [22], biconcave tablets [23], or donut-shaped systems [24]. Only a very few studies refer to coated dosage forms with standard geometry, such as coated pellets. An interesting system has been proposed by Scott and Hollenbeck (1991) [25]: a pellet starter core, which was layered with polymer layers containing different drug concentrations. The drug concentration in these layers increased towards the system's core to compensate the increasing length of the diffusion pathways. A theoretical framework was presented to calculate an optimal drug concentration profile. However, the total coating thickness in this case was about 400 %, which is difficult to manufacture at the industrial scale. Since the drug loaded polymer matrices represented about 80 % of the system's total mass (and the starter core only about 20 %), it was actually more a matrix-type delivery system than a coated reservoir device.

In this study, we present a novel approach to provide about constant drug release for freely water-soluble drugs from coated pellets: Sequential layers of drug and polymer were coated onto sugar or microcrystalline cellulose (MCC) starter cores. Importantly, the polymer layers were initially free of drug. Metoprolol succinate was used as freely water-soluble drug, ethylcellulose and poly(vinyl acetate) as release rate controlling polymers. Both are well established as film coating materials for controlled drug delivery [26]–[28]. The initial drug loading was intentionally low (5 %) to minimize potential drug saturation effects and assure a real formulation challenge. The type, number and sequence of drug and polymer layers was varied. The basic idea was to provide different types of non-homogeneous initial drug distributions, which combined with lag-time effects and partial initial drug diffusion towards the pellet's core, could provide about constant drug release during major parts of the release period.

III. Materials and methods

1) Materials

Metoprolol succinate and propranolol hydrochloride (Safic Alcan, Puteaux, France); sugar starter cores (710 – 850 μm in diameter, Suglets; NP Pharm, Bazainville, France); microcrystalline cellulose starter cores (MCC starter cores, 710 - 850 μm in diameter, Celphere; Seppic, Puteaux, France); hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, Methocel E5; Colorcon, Dartford, UK); aqueous ethylcellulose dispersion (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymers, Brussels, Belgium); aqueous poly(vinyl acetate) dispersion [Kollicoat SR

30D, containing 27 % poly(vinyl acetate), 2.7 % poly(vinyl pyrrolidone), 0.3 % sodium lauryl sulphate and 70 % water; BASF, Ludwigshafen, Germany]; triethyl citrate (Morflex, Greensboro, USA).

2) **Preparation of coated pellets**

Sugar or MCC cores were successively coated with drug and polymer layers (as indicated) in a fluidized bed coater, equipped with a Wurster insert (Strea 1; Niro, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland). For drug layering, a 31.3 % (w:w) aqueous solution of metoprolol succinate or propranolol hydrochloride containing 8.7 % (w:w) HPMC (as a binder) was sprayed, using the following process conditions: inlet temperature = 30 °C, product temperature = 30 ± 2 °C, spray rate = 1.5 – 3 g/min, atomization pressure = 1.2 bar, air volume = 100 m³/h, nozzle diameter = 0.8 mm. Once the desired drug loading was achieved, the pellets were further fluidized for 10 min without spraying any liquid (for drying). The aqueous ethylcellulose dispersion was first diluted with purified water to 15 % (w/w) solids' content and plasticized overnight with 25 % triethyl citrate (w/w, based on the polymer mass) under magnetic stirring. The following process conditions were used: inlet temperature = 35 °C, product temperature = 35 ± 2 °C, spray rate = 1.5 - 3 g/min, atomization pressure = 1.2 bar, air volume = 100 m³/h, nozzle diameter = 0.8 mm. Once the desired coating level was achieved, the pellets were further fluidized for 10 min without spraying any liquid (for drying). The aqueous poly(vinyl acetate) dispersion was first diluted with purified water to 7.5 % (w/w) solids' content and plasticized overnight with 10 % triethyl citrate (w/w, based on the polymer mass) under magnetic stirring. The following process conditions were used: inlet temperature = 30 °C, product temperature = 30 ± 2 °C, spray rate = 1.5 - 3 g/min, atomization pressure = 1.2 bar, air volume = 100 m³/h, nozzle diameter = 0.8 mm. Once the desired coating level was achieved, the pellets were further fluidized for 10 min without spraying any liquid (for drying). Optionally, plasticized aqueous ethylcellulose dispersion was blended with plasticized aqueous poly(vinyl acetate) dispersion 30 min prior to coating (under magnetic stirring). The indicated blend ratio refers to the polymer masses (w:w). All coating percentages refer to the weight of the respective drug or polymer layer with respect to the weight of the coated support. After applying the final coating layer, the pellets were cured in an oven at 60 °C for 24 h.

3) Drug release studies

Drug release from pellets was measured in a USP 39 paddle apparatus (Sotax, Basel, Switzerland) (900 mL; 37 °C, 100 rpm, 1 g pellets per beaker; n=3) in 0.1 M HCl during the first 2 h, followed by phosphate buffer pH 7.4 (USP 39) during the following 6 h (complete medium change). At pre-determined time points, 3 mL samples were withdrawn and analyzed UV-spectrophotometrically ($\lambda = 274$ nm for metoprolol, $\lambda = 289$ nm for propranolol; Anthelie Advanced, Secomam, Domont, France).

IV. Results and discussion

1) Single polymer layers

Figure 1 shows metoprolol release from pellets coated with a single layer of either ethylcellulose or poly(vinyl acetate). The polymer coating level was varied from 2.5 to 7.5 %, as indicated in the diagrams. The starter core consisted either of sugar or MCC, the initial drug loading was 5 % in all cases. Clearly, a classical “curve-shaped” release profile was observed in all cases: At early time points, the release rate was high and then monotonically declined throughout the observation period (the slope of the curve steadily decreased with time). This type of release behaviour is consistent with the hypothesis that drug diffusion through the polymer film coatings plays a major role for the resulting drug release kinetics: Upon contact with the release medium water penetrates into the pellets and dissolves the drug. Since metoprolol succinate is freely water-soluble and the drug loading relatively low, it can be expected that all of the drug is rapidly dissolved. Once dissolved, the drug diffuses through the polymeric film coating out into the surrounding release medium. This latter step is often the slowest one in the cascade of events and can be determining for the overall drug release rate. Since perfect sink conditions are provided throughout the experiments, the driving force for drug release: *the difference in drug concentration "inside the pellets – outside the pellets"* is highest at early time points: The entire initial amount of drug is likely to be rapidly dissolved inside the pellets, whereas the drug concentration outside the system is negligible. Thus, the drug release rate is highest at early time points. With time, more and more drug diffuses out into the surrounding bulk fluid, leading to decreasing drug concentrations inside the pellets (released drug molecules or ions are not replaced) and, hence, decreasing driving forces for diffusion and decreasing drug release rates. In practice, this type of release profile might not be desired, potentially leading to sub-optimal drug concentrations at the site of action: Eventually, toxic drug concentrations might be reached initially and sub-therapeutic concentrations at later time

points (even if drug release is still ongoing, but too slowly). Note that drug diffusion through the film coating might occur through an intact polymeric network and/or water-filled cracks/channels.

When comparing metoprolol release from pellets containing sugar starter cores and MCC starter cores (left versus right hand side in Figure 1), it can be seen that drug release tends to be faster in the case of MCC cores for ethylcellulose film coatings, whereas the opposite is observed with poly(vinyl acetate) coatings. This might be explained as follows: Ethylcellulose films are less flexible than poly(vinyl acetate) films [29], [30]. Thus, the swelling of MCC can be expected to rather easily introduce crack formation within the ethylcellulose coatings in these systems. Once cracks are formed, drug release also occurs through water-filled channels, which is generally much faster than drug diffusion through the intact film coating. In the case of sugar starter cores, the osmotic activity of this freely water-soluble excipient can be expected to drive much more water into the pellets than MCC, creating a “counter current” for drug diffusion out of the pellets, initially slowing down drug release. Furthermore, the co-dissolution of high amounts of sugar might affect drug solubility and/or affect the mechanical properties of the film coatings. In contrast to ethylcellulose, poly(vinyl acetate) is much more flexible and can eventually withstand the (limited) swelling of the MCC cores. In these cases, no or less cracks are formed (or crack formation is delayed) compared to ethylcellulose films and metoprolol release is slower. Furthermore, much lower amounts of water can be expected to be driven into the pellets containing MCC cores compared to sugar cores, leading to less pronounced system swelling and a reduced likelihood of crack formation in poly(vinyl acetate) film coatings, explaining the observed slower drug release.

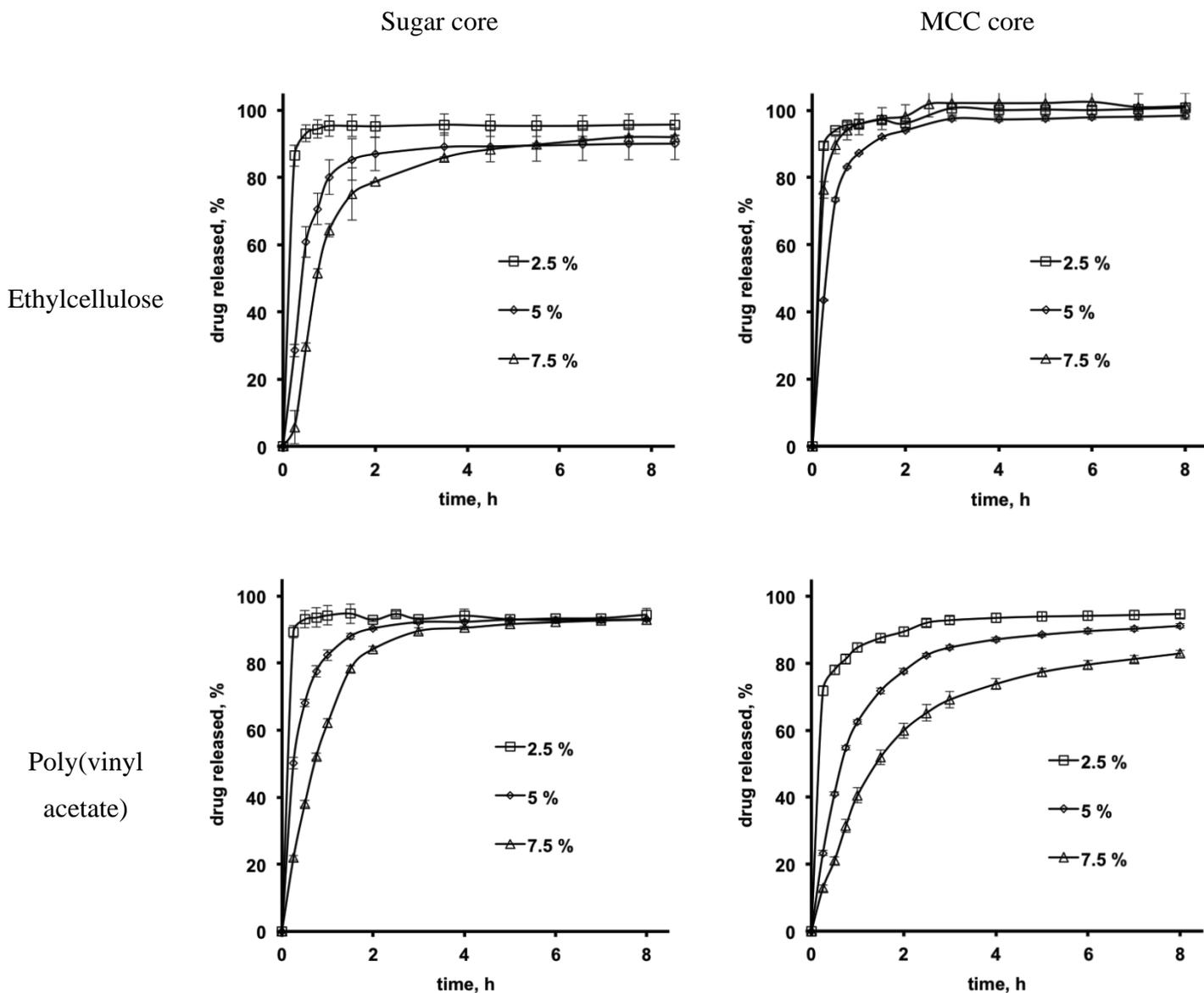


Figure 1: Metoprolol release from pellets coated with ethylcellulose (top row) or poly(vinyl acetate) (bottom row), containing sugar starter cores (left hand side) or MCC starter cores (right hand side). The coating level is indicated in the diagrams. The drug (5 % initial loading) was directly layered onto the starter cores.

One attempt to provide a more constant drug release rate from coated pellets loaded with the freely water-soluble drug metoprolol succinate at a relatively low initial drug loading was to use polymer *blends* instead of single pure polymers. Film coatings based on polymer blends can indeed provide a great potential for controlled drug delivery [31], [32]. The resulting drug release kinetics can be very different from dosage forms coated with a blend of two polymers versus the same systems coated with the respective single polymers. Importantly, this does not only concern the slope of the drug release curves, but also their

shape, since the underlying drug release mechanisms can be altered by polymer blending [33], [34]. In this study, a 50:50 blend of the investigated ethylcellulose and poly(vinyl acetate) film coatings was studied (w:w, based on the polymer masses). The resulting drug release kinetics from pellets containing sugar or MCC starter cores are illustrated in Figure 2. The initial drug loading was again 5 %. The film coating level was varied from 2.5 to 7.5 %, as indicated. Very clearly, drug release was very rapid in all cases and generally much faster than from pellets coated with the pure polymers (Figure 2 versus Figure 1). This probably indicates that no dense polymeric film coatings were formed under these conditions, which might eventually be attributable to non-perfect polymer particle coalescence in the present case (aqueous polymer dispersions were used). Thus, this type of polymer blend does not seem to be very promising to provide zero order drug release for the investigated type of drug and starter cores.

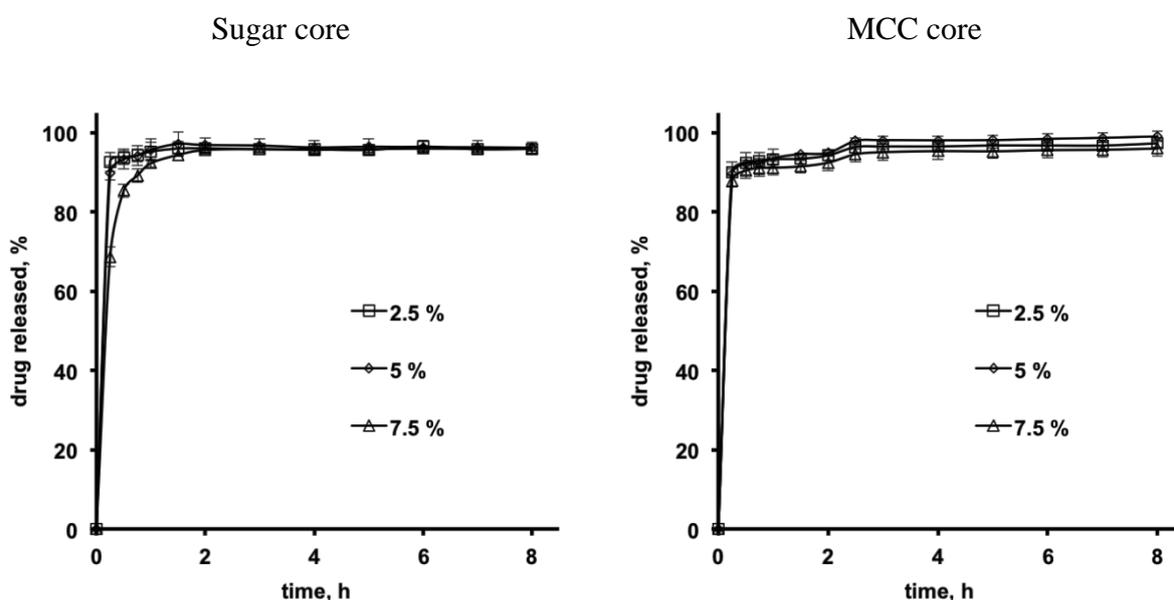


Figure 2: Drug release from pellets coated with 50:50 blends of aqueous dispersions of ethylcellulose and poly(vinyl acetate). The type of starter core is indicated at the top, the coating level in the diagrams. The drug (5 % initial loading) was directly layered onto the starter cores.

2) Sequential polymer layers

The next attempt to provide more zero order-like drug release from coated pellets for the freely water-soluble drug metoprolol succinate was to coat drug layered sugar and MCC cores with sequential layers of the two polymers: ethylcellulose and poly(vinyl acetate). Since the inner film coating structure can be expected to be very different from the inner structure of the above described coatings based on 50:50 blends, different types of release kinetics can result. A general expectation was that the combination of the two polymers (exhibiting different physico-chemical properties) in sequential layers could allow the drug to eventually accumulate differently in these layers and/or that the layers might be differently permeable for the drug. For instance, one type of layer (exhibiting a higher affinity for the drug compared to the other) could eventually act as some kind of "drug reservoir" and/or one type of layer might more easily show crack formation than the other and/or different permeability through the intact macromolecular network, resulting in different hindrance for drug release and a non-homogeneous drug concentration profile within the film coating (according to the respective partition and apparent diffusion coefficients). If metoprolol diffusion plays a major role for the control of drug release, such changes in the drug concentration gradients can be expected to lead to altered drug release profiles. Figure 3 shows the experimentally measured metoprolol release rates from pellets containing sugar starter cores or MCC starter cores, layered with one drug layer (5 % initial loading) and 2, 3 or 4 sequential layers of ethylcellulose and poly(vinyl acetate), as indicated. The coating level of each polymer layer was 2.5 %. The open symbols and dotted curves refer to systems, in which the innermost polymer layer is poly(vinyl acetate), whereas the closed symbols and solid curves correspond to pellets, in which the innermost polymer layer is ethylcellulose. As it can be seen, the success of this strategy to provide zero order release was only limited in all cases: The release profiles remained clearly "curve-shaped". The most promising results were obtained with 4 polymer layers, starting with an inner ethylcellulose coating and containing sugar starter cores. But still, the drug release rate was far from being constant over time in this case.

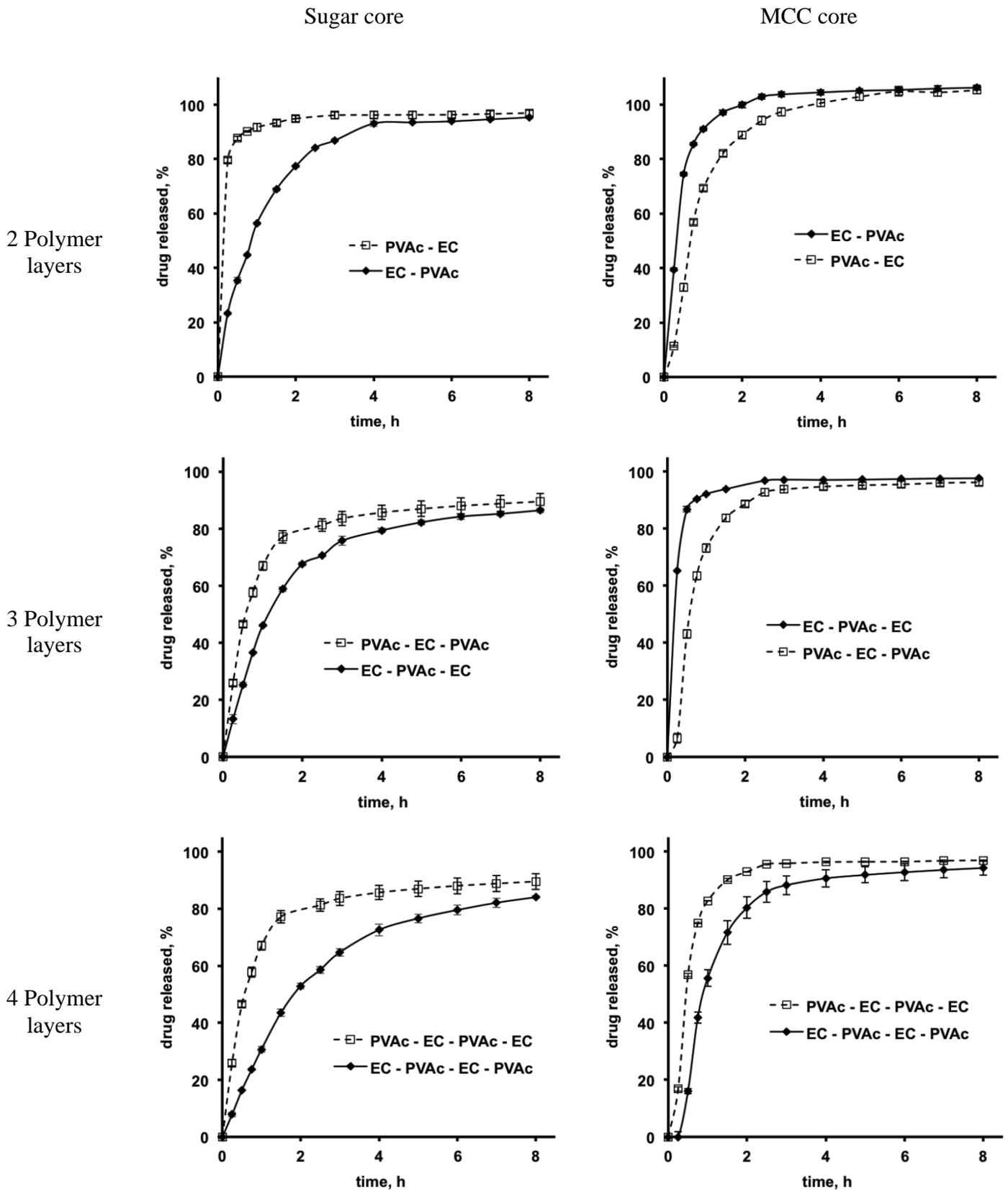


Figure 3: Metoprolol release from pellets coated with 2, 3 or 4 polymer layers, as indicated on the left hand side. The composition and sequence of the polymer layers is given in the diagrams [EC = ethylcellulose; PVAc = poly(vinyl acetate)]. The coating level of each polymer layer was 2.5 %. The type of starter core is indicated at the top. The drug (5 % initial loading) was directly layered onto the starter cores.

Generally, the release rate decreased with increasing number of polymer layers, due to the increasing thickness of the entire barrier to be overcome. Interestingly, drug release was always slower from pellets containing ethylcellulose as the innermost polymer layer when using sugar starter cores. This might eventually be explained by the shielding effect of such an inner ethylcellulose layer: The permeability of this polymer for water is low, limiting the osmotically driven water penetration into the systems due to the presence of the sugar starter cores [35]. In contrast, in the case of MCC starter cores, drug release was only slowest from pellets with ethylcellulose as the innermost polymer layer when 4 polymer layers were applied. In the case of 2 and 3 polymer layers, systems containing poly(vinyl acetate) as the innermost polymer layer showed slower drug release than pellets containing ethylcellulose as the innermost polymer layer. This might eventually be attributable to the fact that in the case of MCC cores the swelling of the MCC results in rapid crack formation in the innermost ethylcellulose layer, whereas the presence of a more flexible poly(vinyl acetate) layer in-between can somehow act as a cushioning layer and delay crack formation. Since pellets containing sugar starter cores, 4 polymer layers, and ethylcellulose as the innermost polymer layer showed the most promising metoprolol release kinetics, this type of system was further optimized by increasing the number of polymer layers: Figure 4 shows drug release from pellets containing sugar starter cores, layered with 5 % metoprolol succinate and subsequently layered with ethylcellulose, poly(vinyl acetate), ethylcellulose etc. The number of polymer layers was varied between 4 and 10, the coating level of each polymer layer was 2.5 or 2 %, as indicated. As it can be seen, the degree of curvature of the release profiles decreased with increasing number of layers in both cases. However, even the 10 polymer layer pellets did not show zero order-like drug release. Thus, this approach seems to be insufficient.

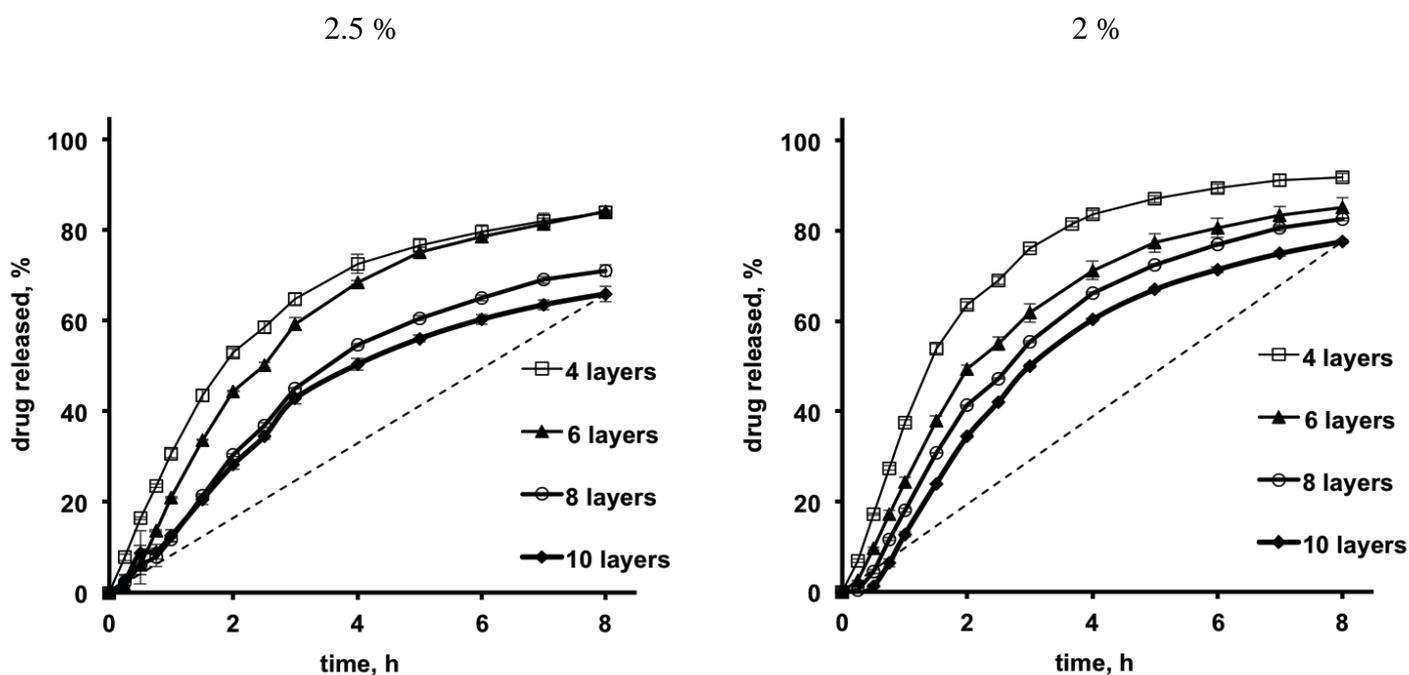


Figure 4: Impact of the number of polymer layers (indicated in the diagrams) on metoprolol release from pellets containing sugar starter cores. The cores were layered with drug, followed by alternating coatings with ethylcellulose and PVAc. On the left hand side the coating level of each polymer layer was 2.5 %, on the right hand side it was 2 %. The drug (5 % initial loading) was directly layered onto the starter cores. The dotted straight lines are intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics for the most promising formulations.

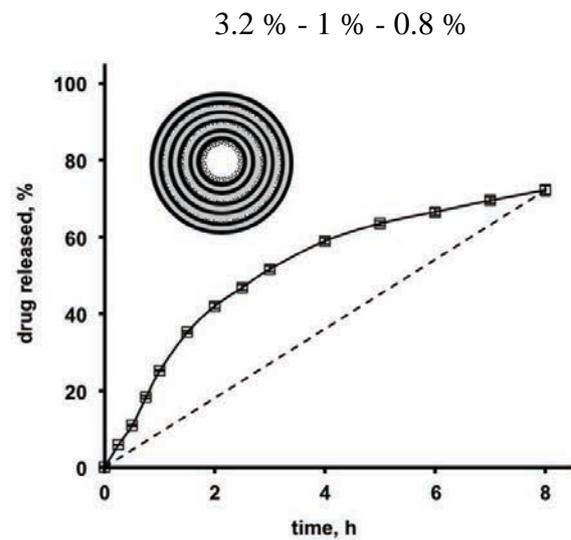
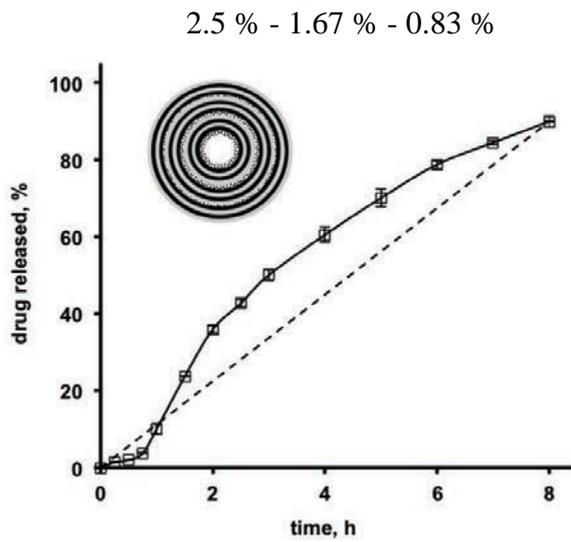
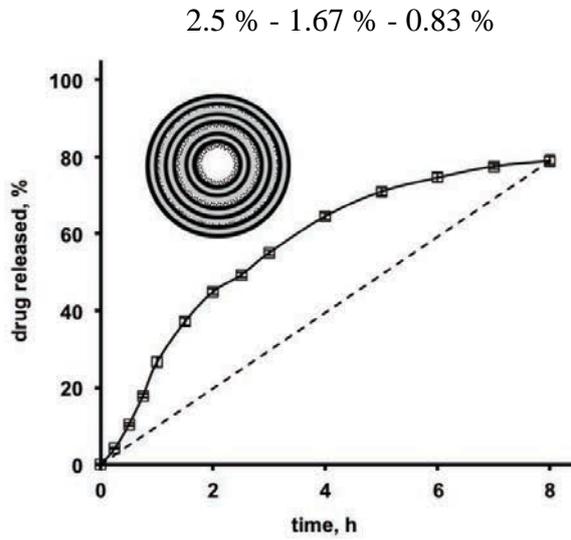


Figure 5: Drug release from pellets containing sugar starter cores (marked in white), 2 drug layers (marked with black dots) and multiple ethylcellulose (marked in black) and PVAc (marked in grey) coatings. The coating level of each polymer layer was 2.5 %, the coating levels of the 2 drug layers (from the inside to the outside) are indicated at the top of each diagram. For reasons of visibility, the size of the starter core and thickness of the layers in the schemes are not up to scale. The dotted straight lines are intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics.

3) Sequential drug and polymer layers

The next strategy used to provide more constant drug release from the investigated pellets was to divide the total drug dose into 2 or more layers, separated by initially drug-free polymer layers. The basic idea is that the increase in the length of the diffusion pathways with time could eventually be compensated by an increase in the concentration difference: The more inner drug layer(s) was (were) loaded with more drug than the outer drug layer(s). In addition, lag-time effects and partial initial drug diffusion *towards the pellet's core* might contribute to achieving more constant drug release: Once the drug of an inner drug layer dissolves, it diffuses into the neighbouring *inner* and the neighbouring *outer* (initially drug-free) polymer layers. This is because concentration gradients initially exist into both directions: towards the pellet's surface and towards the pellet's core. Figure 5 shows the experimentally measured metoprolol release kinetics from pellets containing sugar starter cores, layered with a first drug layer containing 2.5 or 3.2 % drug, followed by an ethylcellulose layer, a poly(vinyl acetate) layer, an ethylcellulose layer, a poly(vinyl acetate) layer, followed by a second drug layer containing 1.67 or 1 % drug, followed by an ethylcellulose layer, a poly(vinyl acetate) layer, an ethylcellulose layer, and a poly(vinyl acetate) layer. The schemes in the diagrams schematically illustrate the various layers [sugar core = white, drug = black dots, ethylcellulose = black, poly(vinyl acetate) = grey]. Note that the size of the starter core and thickness of the layers are not up to scale, for reasons of visibility. The coating level of each polymer layer was 2.5 %. Comparing the left and the right diagram in Figure 5, it can be seen that the general principle of providing drug layers with higher loadings closer to the pellet's core and lower loadings closer to the pellet's surface somehow results in less variable drug release rates. However, drug release was still not zero order-like. This is why the number of drug layers was further increased: Figures 6 and 7 illustrate metoprolol release from pellets containing 3 or 4 drug layers, respectively. The loadings of the different drug layers with metoprolol succinate are indicated at the top of each diagram (from the inside to the outside). The scheme in each diagram illustrates the sequence of the various polymer layers in the respective system. The difference between the pellets in the top and middle diagram in Figure 6 is the presence of an additional outer poly(vinyl acetate) layer in the middle diagram. As it can be seen, drug release was still not zero order-like, despite of the complexity of the systems containing multiple drug and polymer layers. The most promising results were obtained with a 3 drug layer and 12 polymer layer system, exhibiting a certain lag time (middle diagram in Figure 6).

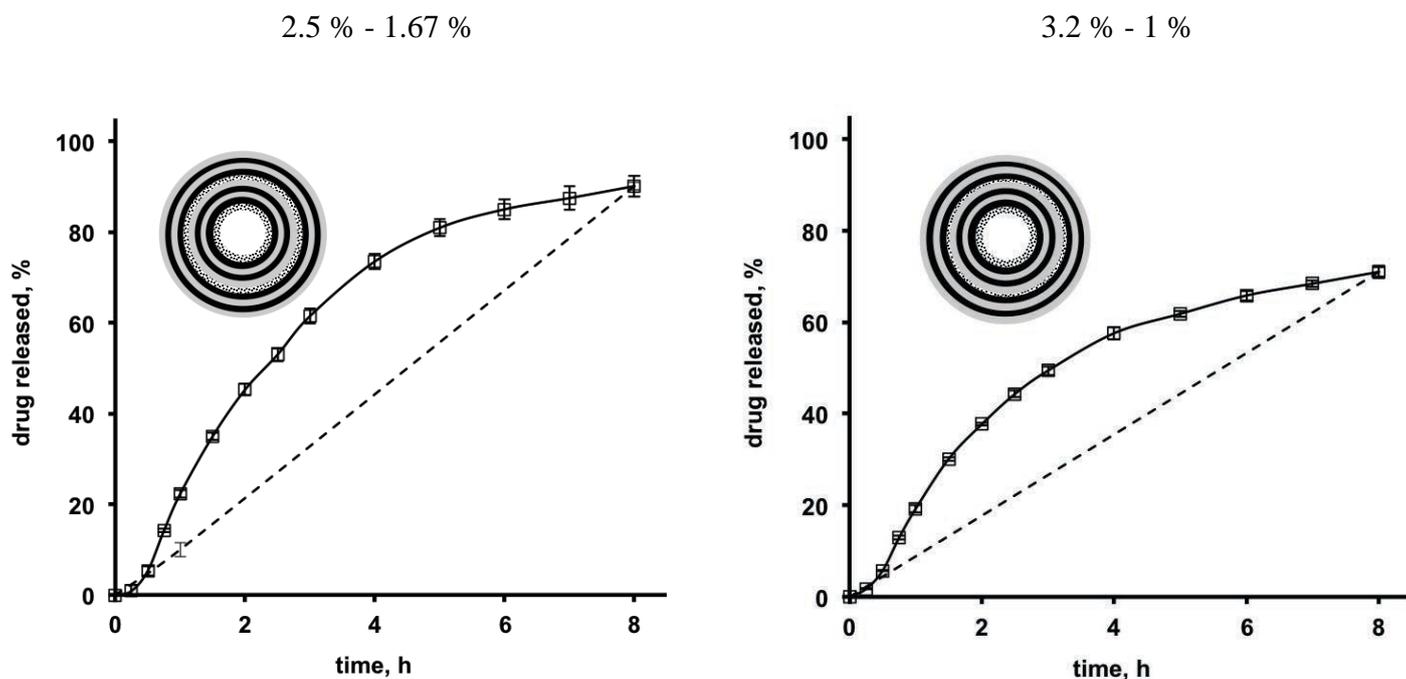


Figure 6: Drug release from pellets containing sugar starter cores (marked in white), 3 drug layers (marked with black dots) and multiple ethylcellulose (marked in black) and PVAc (marked in grey) coatings. The coating level of each polymer layer was 2.5 %, the coating levels of the 3 drug layers (from the inside to the outside) are indicated at the top of each diagram. For reasons of visibility, the size of the starter core and thickness of the layers in the schemes are not up to scale. The difference between the pellets in the top and middle diagram is the presence of an additional outer PVAc layer in the middle diagram. The dotted straight lines are intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics.

1.8 % - 1.4 % - 1 % - 0.8 %

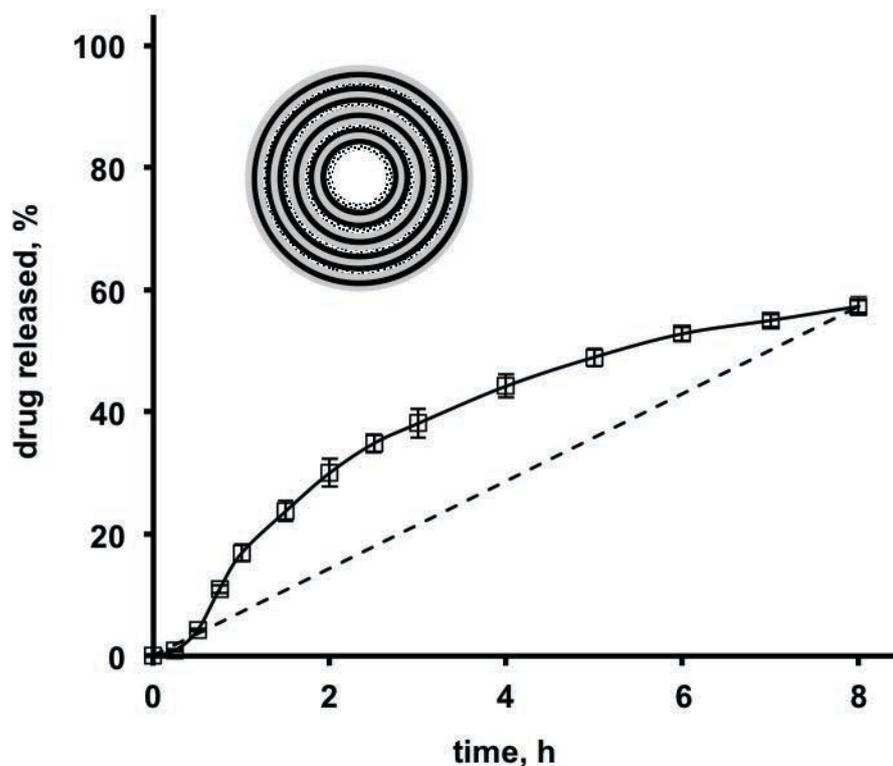


Figure 7: Drug release from pellets containing sugar starter cores (marked in white), 4 drug layers (marked with black dots) and multiple ethylcellulose (marked in black) and PVAc (marked in grey) coatings. The coating level of each polymer layer was 2 %, the coating levels of the 4 drug layers (from the inside to the outside) are indicated at the top. For reasons of visibility, the size of the starter core and thickness of the layers in the schemes are not up to scale. The dotted straight line is intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics.

To simplify the film coating structure, only one type of polymer was used in the following and the number of drug layers was reduced to only 2. Interestingly, in this case a rather constant drug release rate could be obtained: Figure 8 shows metoprolol release from pellets containing a sugar starter core, layered with 3 % drug, 7.5 % poly(vinyl acetate), 2 % drug and again 7.5 % poly(vinyl acetate). Looking closer at the curve, it can be seen that the initial phase of drug release (during the first 2-3 h) seems to be partially affected by some lag-time effects. Thus, the general strategy to divide the total drug dose into different layers with higher loadings closer to the pellet's core and being separated by initially drug-free polymer layers, seems to be suitable to allow for about constant release of freely water-soluble drugs from coated pellets. Importantly, the film coatings can simply consist of 2 drug and 2 polymer layers (using only 1 drug-coating formulation and 1 polymer-coating formulation for spraying).

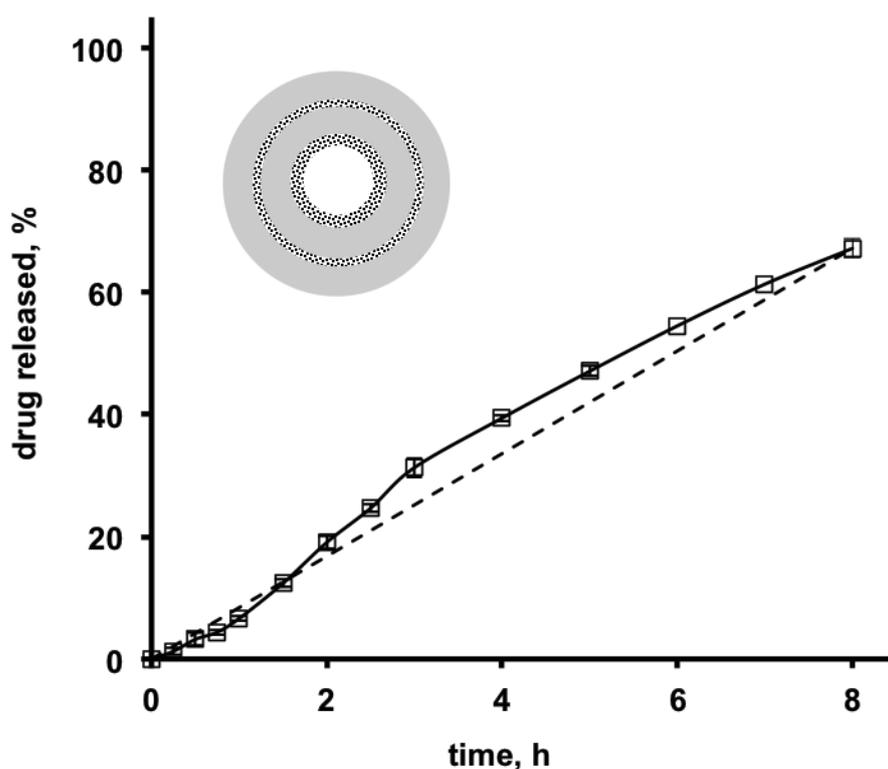


Figure 8: Metoprolol release from pellets containing sugar starter cores (marked in white), 2 drug layers (marked with black dots) and 2 PVAc layers (marked in grey). The coating level of the polymer layers was 7.5 %, the coating levels of the 2 drug layers (from the inside to the outside) are indicated at the top. For reasons of visibility, the size of the starter core and thickness of the layers in the schemes are not up to scale. The dotted straight line is intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics.

To evaluate the applicability of the proposed strategy to provide about constant drug release from coated pellets loaded with low amounts of a freely water-soluble drug, the same formulation as shown in Figure 8 was prepared, but replacing metoprolol succinate by propranolol hydrochloride. As it can be seen in Figure 9, relatively constant drug release was observed also in this case. Thus, the presented formulation approach is transferable to other types of drugs. Note that fine tuning of the compositions and thicknesses of the respective coating layers on a case-by-case basis can be expected to allow for further optimization of drug release.

3 % - 2 %

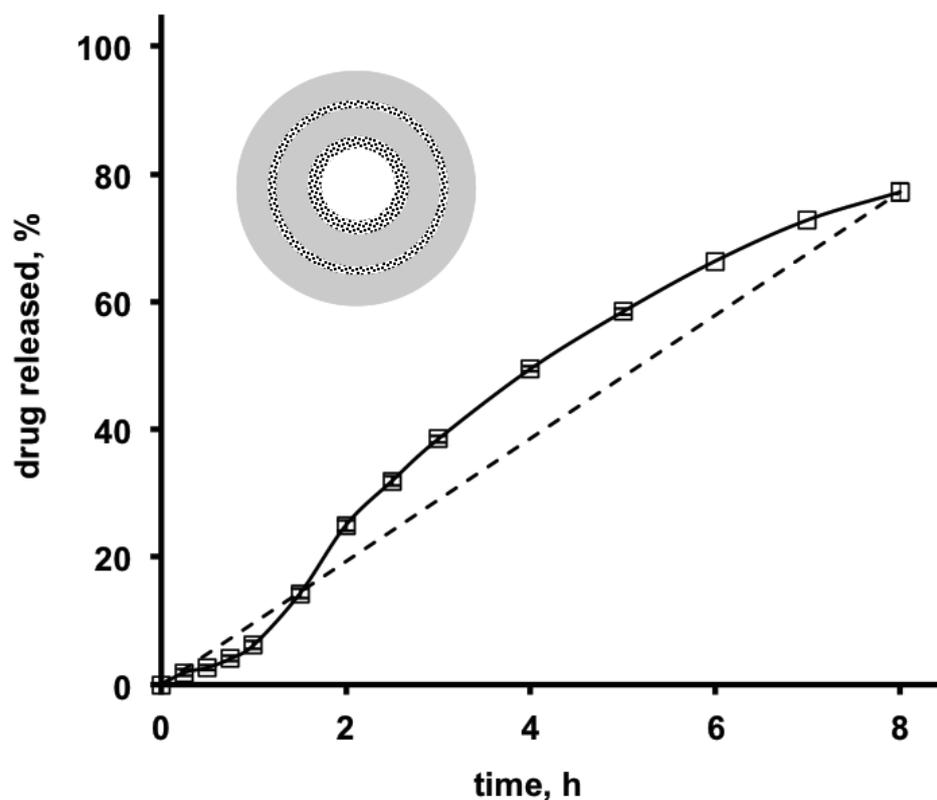


Figure 9: Propranolol release from pellets containing sugar starter cores (marked in white), 2 drug layers (marked with black dots) and 2 PVAc layers (marked in grey). The coating level of the polymer layers was 7.5 %, the coating levels of the 2 drug layers (from the inside to the outside) are indicated at the top. For reasons of visibility, the size of the starter core and thickness of the layers in the schemes are not up to scale. The dotted straight line is intended to help visualizing deviation from zero order release kinetics.

V. Conclusions

To provide relatively constant drug release rates of freely water-soluble drugs (even at low initial loadings) from coated pellets, the drug dose can be divided into different layers, separated by initially drug-free polymer layers. A decrease in the release rate with time due to the increasing length of the diffusion pathways can be compensated by providing higher drug loadings closer to the pellet's core, resulting in increased concentration differences with the surrounding medium. In addition, lag-time effects and partial initial drug diffusion towards the pellet's core are likely to contribute to the resulting near zero order release profile. Importantly, the system can be rather simple: 2 drug and 2 polymer layers with a total coating level of only 20 % allow achieving about constant release in the case of freely water-soluble metoprolol succinate. Since standard coating equipment and conditions can be used, up-scaling can be expected to be similar as for conventional coated controlled release pellets.

VI. References

- [1] J. Siepmann, R. Bodmeier, et J. W. McGinity, « Progress in film coating », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 361, déc. 2013.
- [2] K. Kolter, A. Dashevsky, M. Irfan, et R. Bodmeier, « Polyvinyl acetate-based film coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 470-479, déc. 2013.
- [3] D. Sauer, M. Cerea, J. DiNunzio, et J. McGinity, « Dry powder coating of pharmaceuticals: A review », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 488-502, déc. 2013.
- [4] J. Siepmann et F. Siepmann, « Stability of aqueous polymeric controlled release film coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 437-445, déc. 2013.
- [5] M. Haaser, K. Naelapää, K. C. Gordon, M. Pepper, J. Rantanen, C. J. Strachan, P. F. Taday, J. A. Zeitler, et T. Rades, « Evaluating the effect of coating equipment on tablet film quality using terahertz pulsed imaging », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no 3, Part B, p. 1095-1102, nov. 2013.
- [6] A. Maroni, L. Zema, G. Loreti, L. Palugan, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral pulsatile release », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 362-371, déc. 2013.
- [7] A. Maroni, M. D. Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Film coatings for oral colon delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no 2, p. 372-394, déc. 2013.
- [8] J. Siepmann et F. Siepmann, « Mathematical modeling of drug delivery », *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no 2, p. 328-343, déc. 2008.
- [9] J. Siepmann et F. Siepmann, « Modeling of diffusion controlled drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 161, no 2, p. 351-362, juill. 2012.
- [10] P. I. Lee, « Novel approach to zero-order drug delivery via immobilized nonuniform drug distribution in glassy hydrogels », *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no 10, p. 1344-1347, oct. 1984.
- [11] P. I. Lee, « Effect of non-uniform initial drug concentration distribution on the kinetics of drug release from glassy hydrogel matrices », *Polymer*, vol. 25, no 7, p. 973-978, juill. 1984.
- [12] P. I. Lee, « Initial concentration distribution as a mechanism for regulating drug release from diffusion controlled and surface erosion controlled matrix systems », *J. Controlled Release*, vol. 4, no 1, p. 1-7, juin 1986.
- [13] N. James Chang et K. J. Himmelstein, « Dissolution-diffusion controlled constant-rate release from heterogeneously loaded drug-containing materials », *J. Controlled Release*, vol. 12, no 3, p. 201-212, mai 1990.
- [14] M. P. Danckwerts, « Development of a zero-order release oral compressed tablet with potential for commercial tableting production », *Int. J. Pharm.*, vol. 112, no 1, p. 37-45, nov. 1994.
- [15] P. Hildgen et J. N. McMullen, « A new gradient matrix: Formulation and characterization », *J. Controlled Release*, vol. 34, no 3, p. 263-271, juin 1995.

- [16] U. Conte, L. Maggi, P. Colombo, et A. La Manna, « Multi-layered hydrophilic matrices as constant release devices (Geomatrix™ Systems) », *J. Controlled Release*, vol. 26, no 1, p. 39-47, juill. 1993.
- [17] D. Hariharan, N. A. Peppas, R. Bettini, et P. Colombo, « Mathematical analysis of drug delivery from swellable systems with partial physical restrictions or impermeable coatings », *Int. J. Pharm.*, vol. 112, no 1, p. 47-54, nov. 1994.
- [18] Y. Qiu, N. Chidambaram, et K. Flood, « Design and evaluation of layered diffusional matrices for zero-order sustained-release », *J. Controlled Release*, vol. 51, no 2-3, p. 123-130, févr. 1998.
- [19] N. Chidambaram, W. Porter, K. Flood, et Y. Qiu, « Formulation and characterization of new layered diffusional matrices for zero-order sustained release », *J. Controlled Release*, vol. 52, no 1-2, p. 149-158, mars 1998.
- [20] V. Malaterre, J. Ogorka, N. Loggia, et R. Gurny, « Oral osmotically driven systems: 30 years of development and clinical use », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 73, no 3, p. 311-323, nov. 2009.
- [21] D. S. T. Hsieh, W. D. Rhine, et R. Langer, « Zero-order controlled-release polymer matrices for micro- and macromolecules », *J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no 1, p. 17-22, janv. 1983.
- [22] B. Narasimhan et R. Langer, « Zero-order release of micro- and macromolecules from polymeric devices: the role of the burst effect », *J. Controlled Release*, vol. 47, no 1, p. 13-20, juill. 1997.
- [23] A. Y. Benkorah et J.-N. McMullen, « Biconcave coated, centrally perforated tablets for oral controlled drug delivery », *J. Controlled Release*, vol. 32, no 2, p. 155-160, déc. 1994.
- [24] C. Kim, « Compressed Donut-Shaped Tablets with Zero-Order Release Kinetics », *Pharm. Res.*, vol. 12, no 7, p. 1045-1048, juill. 1995.
- [25] D. C. Scott et R. G. Hollenbeck, « Design and Manufacture of a Zero-Order Sustained-Release Pellet Dosage Form Through Nonuniform Drug Distribution in a Diffusional Matrix », *Pharm. Res.*, vol. 8, no 2, p. 156-161, févr. 1991.
- [26] S. Strübing, H. Metz, F. Syrowatka, et K. Mäder, « Monitoring of dissolution induced changes in film coat composition by 1H NMR spectroscopy and SEM », *J. Controlled Release*, vol. 119, no 2, p. 190-196, juin 2007.
- [27] S. Strübing, T. Abboud, R. V. Contri, H. Metz, et K. Mäder, « New insights on poly(vinyl acetate)-based coated floating tablets: Characterisation of hydration and CO₂ generation by benchtop MRI and its relation to drug release and floating strength », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no 2, p. 708-717, juin 2008.
- [28] F. Siepman, A. Hoffmann, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepman, « How to adjust desired drug release patterns from ethylcellulose-coated dosage forms », *J. Controlled Release*, vol. 119, no 2, p. 182-189, juin 2007.
- [29] F. Lecomte, J. Siepman, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Polymer Blends Used for the Coating of Multiparticulates: Comparison of Aqueous and Organic Coating Techniques », *Pharm. Res.*, vol. 21, no 5, p. 882-890, mai 2004.

- [30] Y. Cuppok, S. Muschert, M. Marucci, J. Hjaertstam, F. Siepmann, A. Axelsson, et J. Siepmann, « Drug release mechanisms from Kollicoat SR:Eudragit NE coated pellets », *Int. J. Pharm.*, vol. 409, no 1-2, p. 30-37, mai 2011.
- [31] F. Siepmann, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Blends of aqueous polymer dispersions used for pellet coating: Importance of the particle size », *J. Controlled Release*, vol. 105, no 3, p. 226-239, juill. 2005.
- [32] F. Siepmann, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Polymer blends for controlled release coatings », *J. Controlled Release*, vol. 125, no 1, p. 1-15, janv. 2008.
- [33] F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « Blends of enteric and GIT-insoluble polymers used for film coating: physicochemical characterization and drug release patterns », *J. Controlled Release*, vol. 89, no 3, p. 457-471, mai 2003.
- [34] F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R. J. MacRae, et R. Bodmeier, « pH-Sensitive Polymer Blends Used as Coating Materials to Control Drug Release from Spherical Beads: Elucidation of the Underlying Mass Transport Mechanisms », *Pharm. Res.*, vol. 22, no 7, p. 1129-1141, juill. 2005.
- [35] S. Muschert, F. Siepmann, B. Leclercq, B. Carlin, et J. Siepmann, « Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets », *J. Controlled Release*, vol. 135, no 1, p. 71-79, avr. 2009.

Résumé :

Les thérapeutiques individualisées et ciblées se développent, les formes galéniques évoluent donc en parallèle pour contrôler la libération des principes actifs (PA). Les formes orales solides représentent les formulations galéniques les plus utilisées, faciles d'emploi, indolores et réduisant le risque d'infection. Les technologies de conception permettent de moduler la libération du PA. Deux approches sont étudiées dans ce manuscrit, l'une correspond au ciblage de la libération d'un PA vers son site d'action thérapeutique qui est le colon, la seconde consiste à contrôler la libération du PA pour maintenir une concentration constante, minimiser les effets indésirables et les concentrations sub-thérapeutiques au niveau du site d'action.

Première approche :

Les traitements des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin peuvent être significativement améliorées par une libération localisée du PA. Une des approches est l'utilisation d'enrobages composés de polysaccharides dégradés par les enzymes sécrétées par la microflore colique. L'absence d'une méthode in vitro reproductible simulant les conditions physiologiques du colon et l'impact potentiel des traitements antibiotiques associés, est un obstacle à sa mise au point. L'objectif de l'étude était d'effectuer un screening de polysaccharides ayant un intérêt dans le développement de nouvelles formulations à libération colique. Après cette sélection, les libérations de PA des formulations retenues ont été évaluées par une méthode utilisant des selles de patients atteints de MICI traités ou non par antibiothérapie. Enfin, l'utilisation de mélanges bactériens pour un éventuel remplacement de l'utilisation de selles fraîches a été évaluée.

Seconde approche :

Les formes orales enrobées présentent un grand potentiel pour la libération contrôlée de PA. Néanmoins, il est difficile d'obtenir une libération à vitesse constante avec celles-ci. Ceci est généralement dû au rôle prédominant du transport de masse par diffusion, ce qui entraîne, avec le temps, une diminution de la concentration en PA au cœur du système, donc une réduction du gradient de concentration qui est la force motrice de la libération du PA. Ce type de cinétique de libération peut être inapproprié pour un traitement médicamenteux sûr et efficace. Malgré l'importance pratique de ce défi crucial de formulation, étonnamment, peu de stratégies efficaces sont connues. Dans cette étude, une nouvelle approche, basée sur une succession de couches de PA et de polymères (initialement dépourvu de PA) présentant une distribution initiale de PA non homogène, associé à un effet de temps de latence et à une diffusion partielle initiale à travers le noyau de la minigranule. Des variations de type, de quantité, d'épaisseur et de séquence des couches de PA et de polymères ont été testées. Un système assez simple composé de quatre couches (deux couches de PA et deux couches de polymère) permettait d'aboutir à une libération relativement constante durant 8h.

Mots-clés : Libération modifiée ; Libération colique ciblée ; Libération d'ordre zéro ; Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin ; Microflore colique ; Enrobage ; Polysaccharides ; ethylcellulose; poly(vinyl acetate); Minigranules.

Membres du jury :

Monsieur DHARANCY Sébastien

Professeur à l'Université de Lille 2 - Praticien Hospitalier au CHRU de Lille

Madame NEUT Christel

PhD à l'Université de Lille 2

Monsieur SIEPMANN Juergen

Professeur à l'Université de Lille 2

Monsieur LAGARCE Frédéric

Professeur à l'Université d'Angers – Praticien Hospitalier au CHU d'Angers ; Rapporteur

Madame LEPAGE Patricia

PhD à l'INRA de Jouy en Josas ; Rapporteur

Monsieur WILS Daniel

ROQUETTE Frères