UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LE SULFATE DE BARYUM COMME TRACEUR POUR SUIVRE L'ÉTAT ET LE TRANSIT INTESTINAL DES COMPRIMÉS MONOLITHIQUES ADMINISTRÉS ORALEMENT

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

MARC-ANDRÉ LABELLE

SEPTEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de maîtrise, Dr. Mircea Alexandru Mateescu pour le partage de ses innombrables connaissances ainsi que son dévouement et sa patience. Je voudrais souligner l'importance d'un bon encadrement et les efforts soutenus et rigoureux de ma superviseure de maîtrise, Dr. Pompillia Ispas-Szabo. L'avancement de ma carrière n'aurait pas été possible sans leur générosité et leurs encouragements. J'aimerais aussi remercier pour leur implication et leur aimabilité, Dr. Isabelle Masseau et Dr. Younes Chorfi de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (à St-Hyacinthe), merci infiniment pour cette belle oportunité.

J'aimerai remercier toute l'équipe du laboratoire, Armelle, Mireille, Elena, Ladan, Lindsay, Samaneh, Dr. Canh Tien Le ainsi que Victorien, Maziar, Khaleel et spécialement Nassim pour leur support et leur bonne humeur.

Je voudrais remercier Mme. Gisèle Legault pour son aide informatique, Mme. Charlotte De La Chevrotière pour avoir fourni des agitateurs adéquats et pour toute l'assistance prompte concernant l'équipement au laboratoire, Mme. Maryse Henry pour l'aide avec le microscope électronique à balayage, l'attention et la patience de Mr. Gwenaël Chamoulaud pour l'assistance à NanoQAM et Michel Preda pour avoir aimablement effectué les DRX sur les comprimés.

Je dois aussi cette opportunité aux organismes qui ont financé et rendu possible ce projet, la Fondation Courtois ainsi que le Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole de l'Université de Montréal, un Regroupement stratégique soutenu par les Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (CRIPA-FRQNT). Je voudrais remercier aussi la compagnie CIMBAR (Georgie, États-Unis) pour avoir généreusement fourni des échantillons de sulfate de baryum ainsi que Colorcon (Pennsylvanie, États-Unis) pour les grades de cellulose modifiée.

DÉDICACE

À mes parents

et mon garçon Bastien,

qui me donnent envie de me surpasser

jours après jours.

AVANT-PROPOS

Le laboratoire du professeur Mateescu travaille actuellement sur le développement en parallèle d'enzymes thérapeutiques pour l'intestin et d'excipients modulables à base d'amidon. Afin de vérifier *in vivo* le comportement d'une formulation orale et de le comparer aux résultats *in vitro*, il semblait primordial d'adapter une méthode d'imagerie accessible et simple. Le présent ouvrage vise d'abord à étudier les méthodes d'imagerie disponibles pour le trajet gastro-intestinal et plus particulièrement au sujet des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.

Les animaux de laboratoire et les animaux de compagnie font aussi partie des enjeux de l'imagerie. Ils ont une grande importance dans l'industrie pharmaceutique comme modèles et dans la vie en comme patients en médecine vétérinaire. L'adaptation des techniques d'imagerie et la corrélation avec les résultats *in vitro* des techniques et des modèles animaux, a un impact majeur sur les investissements et les développements futurs commerciaux et industriels. Une section discutera donc des similarités et différences entre les modèles animaux et humain.

La radiographie est un aspect important de l'imagerie; une section sera dédiée à l'étude d'un agent opacifiant utilisé en radiologie, pour comprendre les modalités de son utilisation et la portée de ses possibilités.

Afin de voir les avancées récentes dans le domaine de suivi des formulations orales par imageries, un résumé non-exhaustif de la littérature sera présenté.

Finalement sera inclus un rapport sur l'utilisation de sulfate de baryum comme agent opacifiant pour le suivi des formulations orales où seront discutés les impacts de la charge en sulfate de baryum sur des formulations ciblées. Les résultats *in vitro* sont comparés à des tests *in vivo* sur un modèle chien pour voir la corrélation des analyses de laboratoires par rapport à leurs comportements *in vivo* ainsi que les variabilités possibles au niveau du modèle.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES viii
LISTE DES TABLEAUX xi
RÉSUMÉ xiii
ABSTRACT xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE 1
PARTIE I – SECTION THÉORIQUE
CHAPITRE I
LE TRACTUS GASTRO-ENTÉRIQUE EN CONDITIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES
1.1 Le tractus gastrique 8
1.2 Le tractus intestinal 9
1.3 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 10
1.4 Manifestations des maladies inflammatoires observables dans le système digestif 12
CHAPITRE II
LES TECHNIQUES D'IMAGERIE POUR LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL
2.1 La scintigraphie 16
2.2 Approche acoustique 18
2.3 L'imagerie par résonance magnétique nucléaire 18
2.4 Les rayons X 19
2.4.1 Le sulfate de baryum comme agent de contraste pour l'imagerie du tractus gastro-intestinal 22
2.4.2 Le sulfate de baryum en suspension 23
2.4.3 Administration de sulfate de baryum sous forme solide 24
2.4.4 Le sulfate de baryum pour le suivi de l'évolution des maladies 25

2.4.5 Le sulfate de baryum pour le diagnostic vétérinaire 27

2.4.6 Suivi de formulation orale dans des modèles de chien 28

CHAPITRE III
LE CARBOXYMÉTHYLAMIDON COMME EXCIPIENT POUR LES FORMULATIONS ORALES

3.1 L'amidon : structure, historique et caractéristiques 31

3.2 L'amylose type V : conformation, hydrophobicité et complexe d'inclusion 37

3.3 Formes d'amidon modifié 39

3.3.1 L'amidon réticulé 41

3.3.2 Le carboxyméthylamidon 43

3.4 Caractérisation et suivi des formulations orales 48

3.4.1 Caractérisation *in vitro* 49

3.4.2 Corrélation avec des modèles animaux 51

3.4.3 Suivi *in vivo* des formulations orales par rayons X 53

3.4.4 Courte analyse thématique de la littérature 54

CHAPITRE IV
PRÉSENTATION DU PROJET

4.1 Concepts et objectifs 56

4.2 Méthodes de travail 60

PARTIE II – SECTION EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V
LE SULFATE DE BARYUM COMME TRACEUR POUR LE SUIVI *IN VIVO* DES COMPRIMÉS MONOLITHIQUES AVEC UN AGENT BIOACTIF

5.1 Introduction 67

5.2 Materials and methods 71

5.3 Results 74

5.3.1 Formulation approach 75

5.3.2 Tablets characterization in dry phase 76

5.3.3 Tablets characterization in simulated gastric and intestinal fluids 79

5.3.4 Image analysis of the opacifying strength 82

5.3.5 *In vivo* testing 83

5.4 Discussion 86

5.5 Conclusion 91

CHAPITRE VI
DISCUSSION ET CONCLUSIONS
6.1 Caractérisation à sec des comprimés 95

6.2 Simulation du TGI *in vitro* 99

6.3 Suivi des comprimés *in vivo* 101

6.4 Corrélation des temps de désintégration *in vitro* et *in vivo* 102

6.5 Conclusions 103

6.6 Contributions à la recherche réalisées durant la maîtrise 104

6.7 Perspectives 105

Conclusions générales 109

ANNEXE A
A.1 Tableaux synthétiques présentant les références sur l'imagerie des formulations pharmaceutiques de la section 3.4.4 116

A.2 Participation comme coauteur d'un article de revue 118

A.3 Résumés publiés des communications orales 128

A.4 Résumés publiés présentés par affiches 130

RÉFÉRENCES 139

LISTE DES FIGURES

Figure Page

Figure 1.1 Comparaison des ratios des segments du tractus gastro-entérique du porc, du chien et de l'humain. 8

Figure 1.2 Le pH des sections du trajet gastro-entérique de différents vertébrés. 9

Figure 1.3 Phénotypes de la maladie de Crohn. 12

Figure 1.4 Évolution des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. 13

Figure 2.1 Sensibilité et versatilité selon le type d'imagerie. 16

Figure 2.2 Radiographie d'un stade précoce de colite ulcéreuse, technique de énema double contraste. 20

Figure 2.3 Administration de granules de sulfate de baryum 25

Figure 2.4 Suivi avec le sulfate de baryum de l'œsophage d'un patient avec la maladie de Crohn sur une période de 14 ans. 26

Figure 2.5 Le diagnostic par rayons X employant le sulfate de baryum dans un chien atteint d'une dysfonction intestinale. 27

Figure 2.6 Suivi par rayons X d'un comprimé ciblant le côlon dans un chien beagle. 29

Figure 3.1 Historique des structures de l'amidon 31

Figure 3.2 Relation entre la structure des grains d'amidon et le diffractogramme. 32

Figure 3.3 Comparaison des dimensions des différents niveaux structuraux de l'amidon. 33

Figure 3.4 Schéma de l'amidon de pomme de terre organisé en super-hélices 34

Figure 3.5 Comparaison des diffractogrammes en rayons X de différents types d'hélices d'amylose. 34

Figure 3.6 Microscopie électronique à balayage de différents amidons. 36

Figure 3.7 Topographie des régions hydrophobiques de l'amylose 38

Figure 3.8 L'intensité de liens hydrogène de l'amylose selon le type de solvant. ... 39

Figure 3.9 Relation entre la cristallinité, le degré de réticulation et le temps de libération des composés actifs pour des comprimés d'amylose réticulé. 42

Figure 3.10 Comparaison de la dégradation de deux composés par la flore colonique humaine et dans du contenu caecal de rat. 52

Figure 3.11 Analyse thématique non-exhaustive des publications accessibles sur le suivi *in vivo* de formulations orales. 55

Figure 4.1 Concept du suivi d'un comprimé par rayons X 58

Figure 4.2 Présentation schématique des différentes étapes du projet de maîtrise. . 59

Figure 5.1 Comparison of intestine segments length ratio for pig, dog and human. 70

Figure 5.2 Tensile strength of various tablets with BS loadings, based on different polymers. 77

Figure 5.3 Diffractograms of CHI and CHI:BS 1:1 (A), CMS and CMS:BS 1:1 (B) and BS and CMS:BS 1:1 (C). 78

Figure 5.4 RAMAN infrared spectra of dry tablets based on BS alone (A) and on CHI:BS with (B) and without (C) barium sulfate. 78

Figure 5.5 Scanning electron micrographs of tabelts based on CMS alone (A-C) and with 60% BS (D-F), dry (A, D), after 2h in SGF and the frozen and lyophilized (B, E) and after 2h in SGF followed by 2h in SIF and the frozen and lyophilized (C, F). 79

Figure 5.6 Gastric protection and fluid penetration of tablets containins bromocresol green indicator (1% w/w) 82

Figure 5.7 Radiographic evaluation of tablets 83

Figure 5.8 *In vivo* follow-up of selected formulations containing 40% BS. 84

Figure 6.1 Dureté des comprimés à base de différents grades de HPMC et contenant 40% de SB en fonction de leur viscosité. 100

Figure 6.2 Temps de désintégration des comprimés à base de différents grades de HPMC et avec 40% SB dans les fluides simulés. 101

Figure A.1 Le sulfate de baryum pour le suivi des formulations orales ciblant le côlon. 131

Figure A.2 Barium sulfate as tracer for *in vivo* formulation follow-up and its impact on tablet properties..... 133

Figure A.3 Approche alternative à la scintigraphie pour le développement des formulations orales solides. 135

Figure A.4 Corrélation *in vivo in vitro* pour des formulations orales ciblées à base de carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose..... 137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau Page

Tableau 1.1 Les stades actuels de traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les chirurgies possibles. 11

Tableau 3.1 Caractéristiques de différents amidons. 35

Tableau 3.2 Applications du carboxyméthylamidon. 45

Tableau 3.3 Distribution des sites de substitution sur le carboxyméthylamidon dans des solvants organiques avec différents amidons. 47

Tableau 5.1 *In vitro* disintegration times of matrices based on neutral, anionic and cationic polymeric excipients. 76

Tableau 5.2 Disintegration times of tablets based on various formulations following USP <701> procedure. 80

Tableau 5.3 Disintegration times of formulations containing 30 % excipient in various ratios. 81

Tableau 5.4 Disintegration times of tablets kept 2h in SGF and then SIF compared to exposure to SIF only. 85

Tableau 5.5 Correlating in vitro disintegration times of tablets containing BS with CMC as substitute. 85

Tableau A.1 Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi des formulations orales par rayons X. 116

Tableau A.2 Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi de formulations orales par scintigraphie. 117

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ASB :	Albumine de sérum bovin
CHI :	Chitosan
CMC :	Carboxyméthylcellulose
CMA :	Carboxyméthylamidon (*Carboxymethylstarch: CMS*)
UC :	Colite ulcéreuse (*Ulcerative Colitis*)
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DRX :	Diffraction des rayons X
DS :	Degré de substitution
ETEC :	Entérotoxigénique *Escherichia coli*
FGS :	Fluides gastriques simulés
FIS :	Fluides intestinaux simulés
FTIR :	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
HAS :	Amidon à haute teneur en amylose (*High amylose starch*)
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
HPMC :	Hydroxypropylméthylcellulose
i-propanol :	Iso-propanol
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
MEB :	Microscope électronique à balayage
MICI :	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
p.a. :	Post-administration
RX :	Rayons X
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SB :	Sulfate de baryum
TEM :	Tomographie à émission mono-photonique
TEP :	Tomographie à émission de positron
TGI :	Tractus gastro-intestinal (ou trajet gastro-intestinal)
US :	Ultrasons
USP :	Pharmacopée des États-Unis (*United States Pharmacopeia*)

RÉSUMÉ

Le comportement des formulations orales dans le tractus gastro-intestinal a été suivi selon les méthodes utilisées pour l'imagerie du système digestif. Les rayons X utilisent un agent opacifiant comme le sulfate de baryum (SB). Cette méthode s'applique très bien au suivi des formulations orales. Les modalités d'utilisation du SB et son impact sur les comprimés ont été étudiés dans la perspective de suivre une formulation ciblée au côlon. À base de carboxyméthylamidon (CMA, anionique) et de dérivés de cellulose : l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC, neutre) et la carboxyméthylcellulose (CMC, anionique), différentes matrices monolithiques contenant le sulfate de baryum et une protéine ont été obtenues par compression directe. Il fut montré auparavant que le CMA offre une protection gastrique et il a été comparé à la CMC, un excipient anionique commercial. Les comprimés ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage montrant que suite à l'immersion dans les fluides digestifs simulés, le sulfate de baryum, qui est insoluble, demeure dans les pores des matrices polymériques. Des études *in vitro* avec un bain désintégrant (USP <701>) ont permis de déterminer des formulations dont le temps de désintégration concorderait avec le transit dans l'intestin grêle (5h). Ces formulations ont été administrées à un modèle chien beagle et suivies par rayons X. Une bonne corrélation fut observée pour les excipients neutres HPMC ainsi que pour le CMA. Les comprimés à base de CMC furent désintégrés *in vivo* plus rapidement (2h plus rapide). La CMC accélère la dissolution des comprimés et agit comme désintégrant tandis que les matrices neutres (HPMC) ont montré une bonne stabilité comme transporteurs de grandes charges en SB avec des temps de désintégration de plus de 8h. Les matrices ioniques (CMA et CMC) ont montré des temps de désintégration rapides (2-5h). L'ajout de HPMC dans les matrices anioniques a permis de diminuer leur hydrophilicité et de transporter une grande charge en SB (40%) ainsi que de protéines (30%) au-delà de l'estomac. Le ciblage de l'intestin fut possible en utilisant le CMA (18%). Sa solubilité montre une dépendence au pH et il est dégradé en présence de l'α-amylase. La CMC se désintègre aussi au pH de l'intestin mais il est plus sensible au changement de pH gastrique et résiste mal au transit de l'estomac. Le CMA est donc un meilleur candidat que la CMC pour la livraison intestinale. Le SB est demeuré dans les comprimés toute la durée des analyses *in vitro* et *in vivo* et les comprimés étaient observables jusqu'à la désintégration ou l'évacuation. Le suivi par rayons X est donc une bonne technique qui permet l'observation de différents types de matrices.

Mots-clé : carboxyméthylamidon, sulfate de baryum, imagerie, protection gastrique, comprimés monolithiques

ABSTRACT

Title : Barium sulfate as tracer for oraly administered tablets and follow-up by X-rays

The monitoring of the oraly administered formulations can be done in a similar manner as the imaging of the gastro-intestinal tract. As the X-rays technique uses radio-opacying agents to contrast the mucosa, the following of the dosage forms may be done by incorporation of a radio-opacifier (barium sulfate: BS). In the perspective of following a colon targeted formulation, the impact of BS on the matrices was studied and also the modalities for its radiographic uses. The different matrices were made of carboxymethylstarch (CMS, anionic) and cellulose derivatives: hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, neutral) and carboxymethylcellulose (CMC, anionic). The monolithic tablets (300-500 mg) containing the BS and a protein model were obtained by direct compression. It was previously shown that the anionic CMS could offer gastric protection and it was now compared to the commercial anionic excipient CMC. The behavior of the tablets in simulated digestive fluids was studied by scanning electron microscopy, showing that the BS stayed in the pores of the polymeric matrices. The *in vitro* studies in the disintegration bath (USP <701>) allowed the selection of formulations with disintegration times consistent with the transit in the small intestine (5h). These formulations were administered to a beagle dog model and followed by X-rays. A good correlation was observed with the *in vitro* results for the matrices of neutral HPMC and of anionic CMS. Higher susceptibility to the changes in gastric pH were observed for CMC which acted more as a disintegrant. In conclusion, neutral matrices showed good carrying capacities beyond the stomach for the high loadings in BS (40%) and protein (30%). The targetting of the small intestine was possible due to the susceptibility of the CMS to the intestinal pH and to α-amylase. Disintegration of CMC was also observed in the intestine but it has greater sensitivity to the variations in the gastric pH and acted more like a disintegrant. The CMS is therefore a better candidate than CMC for targetting of the intestine. The BS remained in the tablets in all the analysis and *in vivo*, and the tablets were all observable until complete disintegration. It was concluded that the BS is a good imaging tracer that can integrate different matrix types.

Keywords : Carboxymethylstarch, barium sulfate, imaging, gastric protection, monolithic tablets

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'utilisation des formulations à **administration orale** est une méthode préférentielle pour l'aisance des patients, les coûts et la simplicité de production. Le développement des formulations orales nécessite *a priori* l'utilisation **d'un modèle *in vitro* de simulation du trajet gastro-intestinal (TGI)**. Ces modèles sont bien représentés dans les pharmacopées et suggèrent des modes opératoires permettant de mimer certaines phases du transit dans **le TGI.** Par exemple, le fluide gastrique simulé permet de reproduire le transit dans l'estomac et le test de désintégration mime l'exposition du comprimé à une force mécanique significative.

Ces tests de simulation permettent aussi d'économiser coût, temps et argent par rapport à l'utilisation des êtres vivants comme modèle. Malgrès la bonne reproductibilité qu'offrent les méthodes de la pharmacopée, une différence des résultats est souvent observée *in vivo* car des variations surviennent entre les individus d'une même espèce. Prédire avec justesse les résultats *in vivo* s'avère donc une grande économie de temps et d'argent.

Le site d'absorption dans le tractus gastro-intestinal (TGI) dépend entre autres de l'agent actif mais aussi de l'animal. De plus, le moment et la vitesse de la libération de cet actif dépendent de la formulation. Il est donc possible que les doses de médicament absorbées par l'organisme varient dans le temps. Le concept de la **fenêtre thérapeutique** montre que l'effet d'un médicament sera peu ou pas observé sous une valeur minimale mais deviendra nocif voir létal au-dessus d'une valeur maximale. Les courbes de libération de médicament permettent d'observer ces phénomènes. Or, il en

ressort que malgré les efforts de formulation, certains actifs sont très perméables ou solubles et diffusent vers l'extérieur du comprimé ou se dissolvent. Ces caractéristiques sont propres à chaque médicament, permettant de les placer dans le système de **classification des biopharmaceutiques** pour ainsi prévoir leur comportement (*biopharmaceutics classification system, BCS*). Lorsqu'un actif est très soluble ou très perméable, sa diffusion hors du comprimé peut se faire d'un coup (*dose dumping*), ce qui n'est pas nécessairement souhaitable. L'absorption de l'actif peut aussi être majoritairement dans un organe précis *i.e.* dans l'estomac ou dans l'intestin.

Il est donc important de connaître les caractéristiques du TGI de l'humain mais aussi de ceux des animaux, que ce soit pour bien formuler les médicaments, pour le diagnostic ou la recherche. Pour mieux comprendre la pertinence des outils de simulation du TGI, les caractéristiques du TGI des humains et des animaux seront présentées au **chapitre 1**.

Certaines techniques d'imagerie permettent d'observer de manière non-invasive le **TGI**. Selon la technique utilisée, différentes informations peuvent être obtenues, que ce soit pour la recherche ou le diagnostic. Aussi, elles diffèrent entre elles par leur coût, leur accessibilité et leur aisance pour les patients. Le **chapitre 2** abordera donc les différentes techniques d'imagerie non-invasives, leur utilisation sur l'humain et les animaux et les observations qui peuvent être faites.

Il est donc intéressant de pouvoir moduler le moment de la livraison d'un médicament. Les formulations qui retiennent la libération jusqu'à un moment ou un endroit précis sont nommées **des formulations ciblées**. La concentration en actif est ainsi plus grande où il doit agir et moins grande, voir nulle, ailleurs dans le corps. Elles permettent d'éviter les pertes coûteuses en actif par détérioration ou élimination mais aussi de limiter les effets nocifs.

La livraison ciblée d'un médicament sert à la conception d'agents antitumoraux par exemple ou peuvent cibler différents organes. C'est le cas de **la livraison ciblée à l'intestin**. Comme l'acidité de l'estomac pourrait modifier l'efficacité des agents actifs et que certains médicaments ne sont absorbés qu'à l'intestin, il est pertinent de protéger les formulations du transit gastrique. Il est aussi intéressant de concevoir une libération qui s'active seulement lorsqu'elle atteint l'intestin.

Il existe bien **des types de formulations orales** mais **le comprimé** est sans doute le plus simple et le plus rapide à produire. Le mélange des excipients en poudre est porté dans un moule et compressé avec une pression et un temps déterminé. Autrefois, la fonctionnalisation du comprimé (par exemple la protection contre l'acidité de l'estomac) était uniquement possible par l'enrobage de ce dernier dans un matériau ayant les propriétés souhaitées. Le **principe de protection gastrique** est basé sur la solubilité en fonction du pH; le matériau doit être insoluble en acide et soluble a pH plus haut. Les premiers **enrobages dit 'entériques'** étaient faits de résines naturelles et donnaient des résultats variables. Les polymère synthétiques et semi-synthétiques qui ont été mis au point sont fiables et performants mais demeurent synthétiques. Il serait donc pertinent de pouvoir offrir une protection gastrique sans l'utilisation d'un enrobage qui augmente le coût et le temps de production.

Pour un comprimé **monolithique sans enrobage**, il est possible d'utiliser des excipients fonctionnalisés qui transmettent certaines caractéristiques à l'ensemble du comprimé. Plus récemment, des comprimés offrant une protection gastrique sans enrobage ont été mis au point en fonctionnalisant un excipient de source naturelle, **l'amidon**. L'amidon natif est insoluble et demeure insoluble après gélatinisation et séchage car il se rétrograde à sa forme granulaire. La **greffe de groupement carboxyméthyle** permet d'augmenter la solubilité et diminuer la rétrogradation. Après compression, le matériau est plus résistant et permet d'obtenir des matrices de comprimés aux propriétés plus intéressantes pour la livraison orale de médicaments.

L'amidon et la cellulose sont les biopolymères les plus utilisés dans le monde. Ils se trouvent en alimentation, en sciences appliquées, en soins médicaux et bien d'autre. En pharmacologie, ils sont utilisés sous formes modifiées comme excipients aux propriétés variées. La cellulose est utilisée entre autres comme agent de remplissage et les dérivées de cellulose comme l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) sont bien connus comme matériaux pouvant former des matrices polymériques. L'amidon est peu utilisé sous sa forme native, il est surtout prégélatinisé, ce qui augmente grandement sa solubilité, ou modifié chimiquement comme le glycolate d'amidon sodique réticulé qui est un désintégrant puissant. Le carboxyméthylamidon (CMA) est peu connu et possède des propriétés intéressantes en tant qu'excipient pour la protection gastrique des médicaments. Le **chapitre 3** traitera donc d'abord de l'amidon natif, sa structure, ses applications, puis de l'amidon modifié, les applications pharmaceutiques et les grands fournisseurs, pour terminer avec une section sur le CMA et les récentes avancées dans le domaine.

La caractérisation des comprimés par les méthodes physico-chimiques classiques, comme la résistance mécanique et la spectroscopie, sera aussi abordée au **chapitre 3** et expliquera comment le transit dans le TGI est simulé *in vitro* pour évaluer le comportement des comprimés.

L'étude par imagerie du transit des formulations orales *in vivo* peut être effectuée au niveau de la recherche scientifique pour valider les résultats *in vitro*. Elle peut aussi faire partie du processus industriel de développement des formulations pour les études de pharmacocinétiques. Lorsque l'ingrédient actif d'une formulation est destiné à s'absorber dans le sang, la cinétique de libération peut être suivie par des analyses biologiques. Au contraire, dans le cas de la livraison de protéines ou d'enzymes qui ne seront pas absorbés dans la circulation, la livraison peut être estimée selon le moment de la désintégration du comprimé *in vivo*. À cette fin, l'imagerie du TGI par rayons X s'adaptent au suivi des comprimés en y incorporant un agent opacifiant, le sulfate de

baryum, ce qui sera aussi discuté au **chapitre 3**. Une courte analyse de la littérature sur les principales publications au sujet de l'utilisation du sulfate de baryum pour le suivi des formulations sera présentée à la fin du chapitre.

Le sulfate de baryum (SB) est donc utilisé pour le suivi des comprimés par rayons X. Il existe toutefois peu d'article sur l'effet du SB, son impact sur les matrices neutres et ioniques. Il serait donc intéressant de voir les interférences possibles en spectroscopie ou *i.e.* l'effet de la charge en SB sur la dureté des comprimés. À cette fin, l'impact du SB sera étudié sur différentes caractéristiques des comprimés telles que le temps de désintégration dans les fluides gastro-intestinaux, la protection contre l'acidité gastrique ou l'interaction avec un autre excipients. Afin d'éventuellement transporter un contenu biologiquement actif, une protéine modèle sera aussi intégrée aux comprimés. Ces comprimés ont été administrés à un chien, suivis par rayons X et les résultats ont été comparés à ceux obtenus *in vitro*. Le **chapitre 4** présente donc le projet, les objectifs, les hypothèses et un schéma global résumant les diverses étapes du développement des formulations ciblées, leur caractérisation et les administrations *in vivo* et la partie expérimentale se trouve au **chapitre 5.**, sous forme d'article en vue de publication. Il décrit les démarches et outils utilisés pour développer et caractériser le comprimé incorporant le SB ainsi que le protocole d'administration au chien. Des discussions et résultats supplémentaires se trouvent dans le **chapitre 6** ainsi que la conclusion du projet. L'auteur du présent mémoire a aussi participer comme co-auteur à la rédaction d'un article scientifique déjà publié et présenté en annexe. Les résultats et expérimentations ont fait l'objet de multiples présentations orales dont les résumés se trouvent aussi en annexe ainsi que les affiches qui ont été exposées.

PARTIE I – SECTION THÉORIQUE

CHAPITRE I

LE TRACTUS GASTRO-ENTÉRIQUE EN CONDITIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES

Lors du développement de formulation pharmaceutique, il est primmordiale d'utiliser un modèle *in vitro* pour faire les tests préliminaires. Principalement pour ne pas mettre en danger la vie de quiconque mais aussi pour économiser temps et argent, la mise sur pied d'un tel outil repose sur la compréhension des principales caractéristiques et fonctions du système gastro-intestinal de l'humain. Comme les animaux sont en nombre de plus en plus grand à profiter des soins médicaux et qu'ils sont utilisés pour les études pharmaceutiques *in vivo*, il est pertinent de comprendre les différences et similitudes entre chacuns. Dans le but de suivre un comprimé ciblant les intestins pour le traitement des maladies de l'intestin inflammé, il sera aussi question des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs), leurs manifestations et traitements actuels.

La diète et les habitudes de vie impactent sur certaines caractéristiques du système digestif telles que la vitesse de transit, le volume et le pH des fluides. Les différences entre les espèces peuvent être mises en évidence en comparant divers aspects physiques et physiologiques. Par exemple, la longueur et le volume de chaque organes du tractus gastro-intestinal (TGI) sont variables. Il peut être intéressant de les comparer selon la longueur des organes par rapport à la masse de l'animal **(figure 1.1)**. Cela permet, entre autres, de constater que l'humain, le chien et le porc ont le même ratio des sections d'intestin par rapport à la longueur totale du tractus.

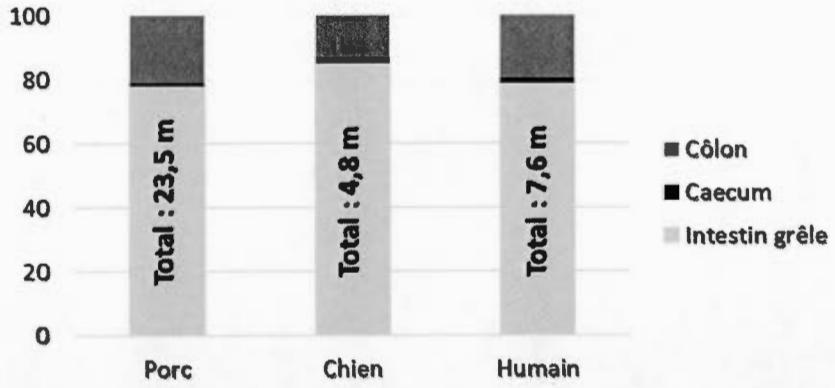


Figure 1.1 Comparaison des ratios des segments du tractus gastro-entérique du porc, du chien et de l'humain. Les grandeurs sont différentes mais les ratios sont semblables, adaptation d'après (Kararli, 1995).

Malgré les dimensions du TGI bien plus grandes chez le porc (24,5 m pour tout l'intestin du porc contrairement à 7,6 m pour l'humain), en tenant compte du ratio par rapport à la longueur, le tractus est davantage semblable à celui de l'humain que les plus petites espèces. Même si la bouche et l'œsophage en font partie intégrante, ce sont plutôt l'estomac et l'intestin qui sont intéressants à des fins de comparaison, parce que le temps de résidence y est plus grand. Ils seront discutés plus en détails dans les prochaines sections.

1.1 Le tractus gastrique

Par rapport à la forme de l'estomac, les chiens, singes et cochons possèdent le même type simple. Par contre, d'autres paramètres peuvent varier. La plus grande variabilité, même inter-espèces, est le temps de vidange de l'estomac. Par exemple, à jeun, le temps de vidange d'un fluide varie de 10 min, 30 min et 1h respectivement pour les rats, lapins et humains (Hatton *et al.*, 2015). Ce temps dépend de la grosseur des particules et du volume d'aliments ingérés, en plus des facteurs externes comme l'exercice et la diète. Les espèces phyllophages (se nourrissent de feuilles) auront souvent, en proportion, un

estomac plus gros pour augmenter le temps de transit, en plus d'un pH plus bas, ce qui augmente l'efficacité de digestion et donc de la symbiose enzymes-bactéries spécialisées. Le porc toutefois montre un pH gastrique plus haut (pH 4.5, **figure 1.2**).

Il y a donc bien de facteurs qui diffèrent entre espèces et entre individus : pH, volume, microbiote et temps de vidange. Toutefois, le pH gastrique reste un des facteurs ayant le plus d'influence sur la pharmacocinétique.

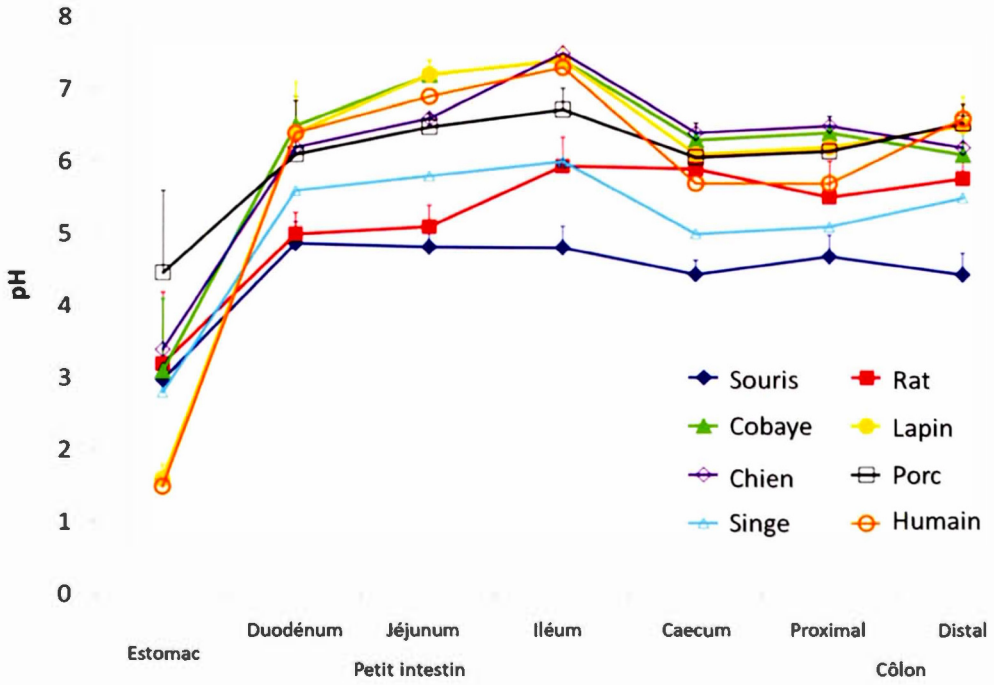


Figure 1.2 Le pH des sections du trajet gastro-entérique de différents vertébrés. Adaptation d'après (Hatton *et al.*, 2015).

1.2 Le tractus intestinal

Le petit intestin du chien est la moitié de la longueur de celui de l'humain. Il compense avec sa grande perméabilité aux nutriments par ses villosités plus longues et minces que celles de l'humain. Effectivement, les villosités sont la différence majeure entre les

espèces, non seulement par leurs formes mais aussi par leurs quantités. Ainsi l'humain a un petit intestin 7 fois plus long que le rat mais aussi avec une surface 200 fois plus grande (Hatton *et al.*, 2015). Cela n'empêche pas le rat et la souris d'être de bons candidats pour les modèles d'administration de composés actifs. Par exemple, le coefficient de corrélation de la biodisponibilité pour des composés cationiques entre la souris et l'humain est de 65%.

Chez le chien, la longueur du cæcum est comparable à l'humain mais son côlon est plus court et diffère de ceux des humains, porcs et singes par l'absence de repli dans la muqueuse, ce qui pourrait contribuer au transit plus rapide des particules que des fluides. L'appendice par exemple, est absent chez le porc et le cobaye. Autrement, les carnivores ont un côlon plus court mais plus spécialisé dans l'absorption des acides aminés tandis que chez les phyllophages il est plus long pour permettre les digestions complexes (i.e. des fibres). Dans la plupart des cas, le pH intestinal est autour de 6,5.

1.3 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (UC) sont des troubles du tractus gastro-intestinal (TGI). Les MICIs touchent 2,5 millions de gens en Europe (0,3% de la population), coûtant prêt de 5 milliards €/an (Burisch *et al.*, 2013) et représentant environ 100 décès/an au Canada (Statistics Canada, 2015). Il est encore difficile de dire précisément quelles sont les causes mais les grandes zones de concentration semblent être l'Europe, l'Amérique du nord et principalement les zones industrialisées. Les informations ayant le plus d'impact sont l'âge au premier diagnostic et la localisation dans le système digestif. Il n'est pas aisé de faire le suivi de ces maladies. Parfois il peut se passer plusieurs mois voire des années sans qu'il n'y ait de manifestations. Les traitements actuels sont peu efficaces ou bien ont des effets secondaires difficiles à supporter. Selon l'avancement de la maladie, différents traitements et chirurgies peuvent être utilisés

(**tableau 1.1**). Au début, la greffe de selles et les produits naturels ont pour but de rebâtir la population microbiotique intestinale et réduire l'inflammation. C'est le stade où la muqueuse est inflammée, mais le transit intestinal est encore possible.

Tableau 1.1 Les stades actuels de traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les chirurgies possibles. Les produits sont par exemple des probiotiques pour rétablir la flore (Baumgart et Sandborn, 2007; Yeh et Morowitz, 2017).

Stade / Avancement	**Traitements pharmaceutiques**	**Chirurgies**
	Produits naturels	Greffe de selles
	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	Enlèvement de polype
	Corticostéroïdes	
	Immunosuppresseurs	Excision d'une partie de l'intestin

Les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont la première ligne de défense médicale. Ils sont peu efficaces, mais ont des effets secondaires minimes. S'ils ne suffisent pas, les corticostéroïdes seront prescrits. Ils sont plus efficaces mais ont des effets secondaires plus prononcés comme le risque d'ostéoporose. Avec l'avancement de la maladie et l'inflammation grandissante, l'intestin pourrait se rétrécir, se rigidifier et le transit deviendra difficile. Les immunosuppresseurs sont alors utilisés. Ils ne sont prescrits qu'en dernier recours car ils affaiblissent tout le système immunitaire. Les régions grandement atteintes seront sujettes à l'ablation par opération chirurgicale.

1.4 Manifestations des maladies inflammatoires observables dans le système digestif

Pour la colite ulcéreuse, l'inflammation est située sur les muqueuses et les sous-muqueuses du côlon tandis que la maladie de Crohn s'étend au-delà des muqueuses et touche tout le TGI (Ambrosini *et al.*, 2007). Les premiers symptômes sont les douleurs abdominales et les diarrhées sanguinolentes ou avec mucus, causées par l'inflammation et l'augmentation de la perméabilité intestinale. Il y a tant de variation à l'expression de la maladie de Crohn (**figure 1.3**) qu'une charte des phénotypes a été établie (Silverberg *et al.*, 2005).

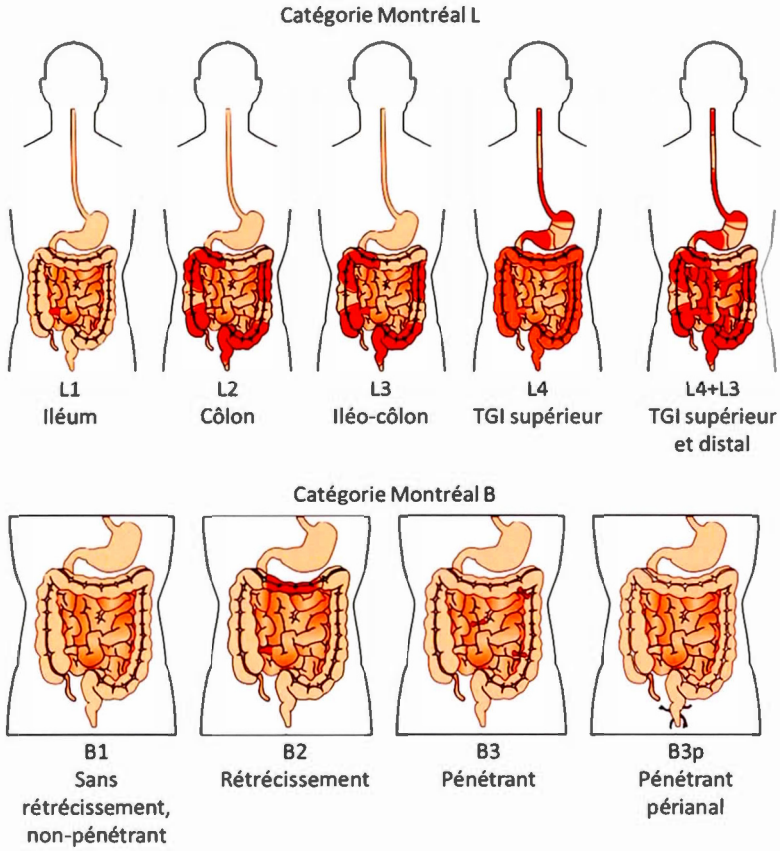


Figure 1.3 Phénotypes de la maladie de Crohn. Le classement comporte deux termes : le L pour les manifestations intra-intestinales majeures associées à un désordre auto-immun et le B pour les manifestations extra-intestinales. TGI : tractus gastro-intestinal. Adaptation d'après (Baumgart et Sandborn, 2012).

Les traitements actuels sont difficiles et ont des effets secondaires. Habituellement, la maladie comporte des stades de dormance et devient plus difficile à suivre (**figure 1.4**). Le but est d'abord de diagnostiquer la maladie et ensuite de suivre le traitement spécifique et observer l'évolution.

Les MICIs se manifestent sous plusieurs niveaux chez l'animal. Par exemple, un problème de structure comme un rétrécissement de l'intestin est causé par une dysfonction du métabolisme qui relève d'un problème immunologique.

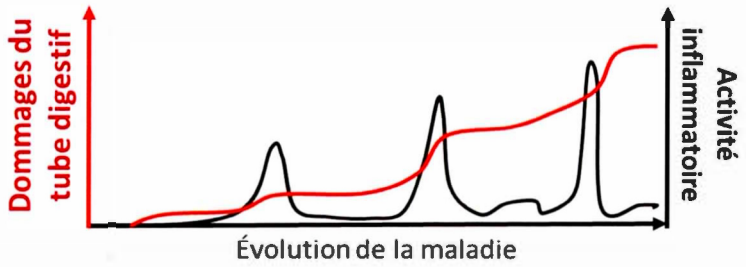


Figure 1.4 Évolution des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Même si l'activité inflammatoire est parfois en dormance, les dommages au tube digestif sont cumulatifs et toujours présents. Adaptation d'après (Baumgart et Sandborn, 2012).

Il est donc possible d'analyser différentes facettes de ces maladies par exemple par des approches radiologiques, immunologiques ou microbiologiques. Le diagnostic idéal combinera tous ces aspects mais nous traiterons dans cet ouvrage le volet imagerie seulement.

CHAPITRE II

LES TECHNIQUES D'IMAGERIE POUR LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) peuvent être diagnostiquées de manière non-invasive par imagerie. Plusieurs techniques d'imagerie existent et permettent d'obtenir différentes informations telles l'état des muqueuses ou la motilité intestinale.

Pendant le développement pharmaceutique, il est intéressant de tester les formulations choisies dans un modèle animal. Certaines techniques d'imagerie permettent de suivre l'état et le transit d'une formulation de manière non-invasive et accomodante pour le sujet. Comme ces même techniques sont courrament utilisées pour certains diagnostiques non-invasifs du tractus gastro-intestinal (TGI), elles seront abordées plus en détail dans ce chapitre pour bien illustrer les enjeux. Les techniques d'imagerie plus connues sont la scintigraphie, effectuée dans les laboratoires de médecine nucléaire, la radiologie, l'imagerie optique (endoscopie), l'imagerie acoustique (échographie par ultrasons) et l'imagerie par résonance magnétique. Chaque technique a un niveau différent de sensibilité, coût, difficulté de mise en oeuvre et danger, elles doivent être sélectionnées rigoureusement selon l'analyse requise.

Une façon simple de les classer est par l'énergie des radiations utilisées, basée sur le spectre électromagnétique. Ainsi, certaines techniques comportent un danger d'exposition et doivent être évitées pour les jeunes patients; certaines radiations sont hautement énergétiques et peuvent induire l'ionisation des composés biologiques, causant des mutations ou d'autre réactions indésirables. Cela relève aussi du temps

d'exposition et de l'intensité des radiations (dose). Par exemple, une très courte exposition à des particules très énergétiques peut être plus dommageable qu'une longue exposition à des particules moins énergétiques.

La scintigraphie permet le suivi des isotopes radioactifs. Ils sont très énergétiques et passent à travers les tissus biologiques. La technique n'a pas d'équivalent car elle permet le suivi de sondes moléculaires ayant des cibles précises. Elle est souvent utilisée, malgré les dangers de la radioactivité, d'où l'importance de bien choisir le type d'analyse pour les MICIs.

Il est possible aussi de les classer selon leurs pouvoirs pénétrants dans les tissus biologiques, ce qui est souvent le paramètre de sélection en laboratoire. Par exemple, l'échographie peut fournir beaucoup d'informations rapidement et à moindre coût mais seulement à faible profondeur. Le facteur de pénétration s'ajoute donc aux autres éléments (coût, aisance et danger).

Une dernière façon de présenter les techniques est en les classant selon le type d'analyses (**figure 2.1**). Le diagnostique par la scintigraphie est plutôt immunologique et indiquera le lieu où se fixe le traceur (section 2.1). L'acoustique, peu dispendieux et rapide est surtout utile pour le prédiagnostique (section 2.2). L'IRM (imagerie de résonance magnétique) observe principalement les tissus et les gras et est donc axé sur le métabolisme (section 2.3). Les RX permettent la visualisation des tissus denses comme les os et sont plutôt destinés à des diagnostics structuraux. C'est la technique la moins sensible mais elle demeure bien adaptée à l'imagerie du système digestif et cela peut être compensé par exemple par l'utilisation d'agent opacifiant en plus grande concentration (section 2.4).

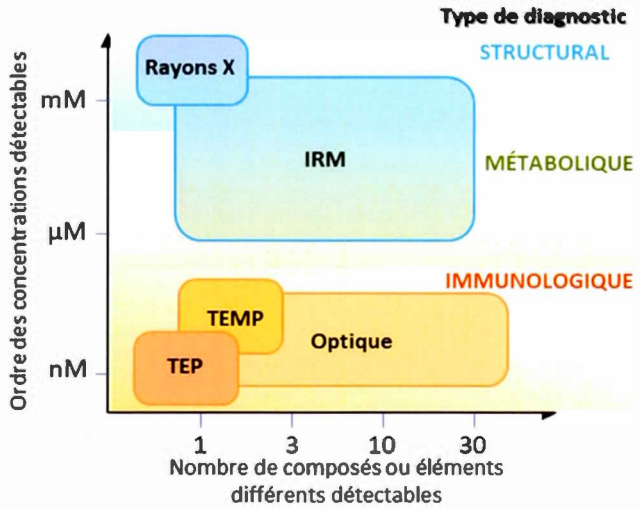


Figure 2.1 Sensibilité et versatilité selon le type d'imagerie. IRM : imagerie par résonance magnétique, TEP : tomographie à émission de positron, TEMP : tomographie à émission monophotonique. Les rayons X sont peu sensibles mais s'adaptent très bien à l'imagerie du système digestif. Adaptation d'après (Pogue, 2015).

L'endoscopie, la colonoscopie et la technique de la vidéo-capsule sont des approches de type optique qui sont efficaces et offrent des diagnostics clairs. Elles sont toutefois peu versatiles, invasives et inconfortables pour le patient. Dans le cas de stade avancé de la colite ulcéreuse, le risque de perforation augmente et des techniques non-invasives seront priorisées (Gotthardt *et al.*, 2013). Par contre, pour la maladie de Crohn, les diagnostics non-invasifs répétés (les RX) peuvent être fréquents et pourraient exposer le patient à des risques (Zakeri et Pollok, 2016); les méthodes d'imagerie doivent être utilisées avec précaution.

2.1 La scintigraphie

Les désintégrations radioactives provoquent des radiations parmis les plus énergétiques utilisées en imagerie. C'est un rayonnement pénétrant qui passe à travers tous les tissus et permet de déterminer la position de l'isotope. Le type de scintigraphie dépend du détecteur car il est possible de mesurer différentes particules issues de la désintégration

d'un isotope. La mesure des positrons est nommée TEP (tomographie à émission de positron) et l'appareillage est dispendieux (2 millions $US), les mesures sont longues, le temps de demi-vie est court et les isotopes sont rares mais la technique montre, selon plusieurs études, une bonne sensibilité et un haut taux de corrélation avec l'activité inflammatoire des MICIs (Gotthardt *et al.*, 2013).

La scintigraphie (effectuée dans des unités de médecine nucléaire) utilise des atomes radioactifs comme le samarium-153 qui sont attachés à des composés actifs (médicaments ou sondes) pour suivre leur déplacement dans le corps. Par exemple, en TEP, le F^{18}-D-glucose est un biomarqueur très important pour la détection du cancer ou de l'inflammation par la technique d'activation des lymphocytes, créant un métabolisme accru, ce qui permet de quantifier l'inflammation (Brewer *et al.*, 2008).

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP, en anglais : *single photon emission computed tomography, SPECT*) utilise plutôt le ^{99}Tc ou le ^{111}I comme marqueurs des MICIs pour détecter la présence des lymphocites ou de récepteurs particuliers (Caobelli *et al.*, 2016). L'appareillage est le quart du prix de la TEP mais le principe de désintégration est différent et l'image obtenue est moins résolue. Parfois, la technique sera choisie en fonction de l'isotope nécessaire car ils ont des interactions et des temps de demi-vie différents dans le corps. La TEMP est moins utilisée que le TEP dans les instituts de médecine, ce qui pourrait expliquer leur popularité différente.

Les deux méthodes permettent la détection des émissions isotopiques en très faibles quantités et sont donc moins dommageables que les techniques de rayons X (figure 2.1). Ces techniques permettent l'investigation et la quantification des MICIs ainsi que la détermination de la rémission. Par contre, malgré la popularité de la TEP, il faut tenir en compte la possibilité d'un phénomène appelé 'hyperfixation', manifestant des résultats faussement positifs par différents mécanismes de métabolisme corporel du glucose (Bonaventure *et al.*, 2009; Caobelli *et al.*, 2016).

2.2 Approche acoustique

Aussi appelée imagerie par ultrasons ou échographie, l'imagerie acoustique est rapide pour obtenir un pré-diagnostic du TGI à faible coût. Le pouvoir pénétrant des ultrasons est faible comparé aux autres techniques et ne permet d'observer que les couches externes du corps et de l'intestin. Toutefois, les ultrasons sont maintenant inclus dans les caméras optiques et permettent des observations multi-approches comme avec la microscopie endoscopique photo-acoustique à résolution optique, OR-PAEM : *Optical Resolution-PhotoAcoustic Endoscopic Microscopy* (Yang *et al.*, 2015), ou bien les ultra-sons endoanals en trois dimension, 3D-EAUS (Alabiso *et al.*, 2016), qui permettent des reconstructions 3D des intestins. Il est possible d'observer facilement les manifestations physiques de la maladie telles les polypes, les fistules, les stades malins et bénins et les sténoses (Cammarota *et al.*, 2009) mais le diagnostic ne peut être complet. Par contre, les avancées récentes ont développé des microbulles pour améliorer le contraste (Quaia, 2013) et la méthode de Power-Doppler permet de voir les zones où le flux sanguin est plus élevé (Dambha *et al.*, 2014). Ces innovations ont montré une bonne précision dans la détermination de l'activité de la maladie de Crohn comparées à l'endoscopie (Gatta *et al.*, 2012).

2.3 L'imagerie par résonance magnétique nucléaire

Cette technique est réputée pour la détection des MICIs car elle différencie facilement les gras et les muqueuses pour détecter les sténoses (Dambha *et al.*, 2014), l'épaississement des parois et les fistules (Alabiso *et al.*, 2016). L'appareil n'émet aucun rayonnement ionisant et est souvent recommandée pour les jeunes patients mais l'analyse n'est pas facile en termes d'immobilité, de solution à ingérer et pour retenir son souffle (Dambha *et al.*, 2014). Cette technique est très dispendieuse et parfois

remise en question mais elle a montré de meilleures performances que la tomographie à RX sur des patients atteints de la maladie de Crohn (Bernstein *et al.*, 2005).

Souvent, une entéroclise est requise. Cela consiste à distancer les parois intestinales à l'aide d'un liquide pour mieux les distinguer (Mentzel *et al.*, 2014). Cette méthode est surtout utilisée pour l'entérographie de l'intestin grêle. L'administration est d'environ un litre et est effectuée oralement ou par cathéter. La solution aqueuse est rapidement absorbée alors le liquide peut être du Metamucil®, du lait, du jus ou une suspension de sulfate de baryum (Mentzel *et al.*, 2014).

2.4 Les rayons X

En radiologie, les **RX** permettent d'observer des manifestations physiques des MICIs qui se retrouvent dans le TGI telles des rétrécissements, l'inflammation (granulosité, texture), des fistules et des ulcères. En scintigraphie, la source de radiation est l'isotope administré, la radiation est très énergétique, elle passe à travers les composés lourds et elle émane de l'intérieur du corps. Différemment, en RX, la source est une lampe externe qui émet des radiations ionisantes un peu moins énergétiques qui passeront à travers les tissus biologiques de faible densité (peau, muscle) mais pas les os (densité élevée). L'exposition aux rayons X, quoi que moins énergétique, est plus grande car elle couvre une surface, ou une section du corps.

En administrant dans le TGI une suspension radio-opaque contenant un élément lourd comme le baryum du sulfate de baryum (SB), il est possible de créer un contraste avec les muqueuses pour visualiser les parois de l'estomac et les intestins de façon précise et obtenir un diagnostic complet. Ces composés sont nommés 'agents de contraste' et 'agents d'imagerie' et permettent de distinguer les signes de la présence d'inflammation.

Les premiers stades de la colite ulcéreuse (UC) peuvent probablement s'observer dans les intestins où, à cause de l'inflammation, il y a des segments dont la muqueuse est d'aspect granuleux et sans plis mucosaux dû à l'augmentation de la rigidité (**figure 2.2**). Au stade avancé, l'aspect granuleux et la disparition des plis s'étend dans des segments entiers. Il est d'autant plus important de détecter rapidement la maladie car les résidus de l'inflammation peuvent former des agglomérats qui deviennent des polypes. Pour la maladie de Crohn ce sera l'apparition d'ulcères qui éventuellement s'étendent dans toute la circonférence en augmentant le risque de formation de fissures, fistules et abcès (Ambrosini *et al.*, 2007).

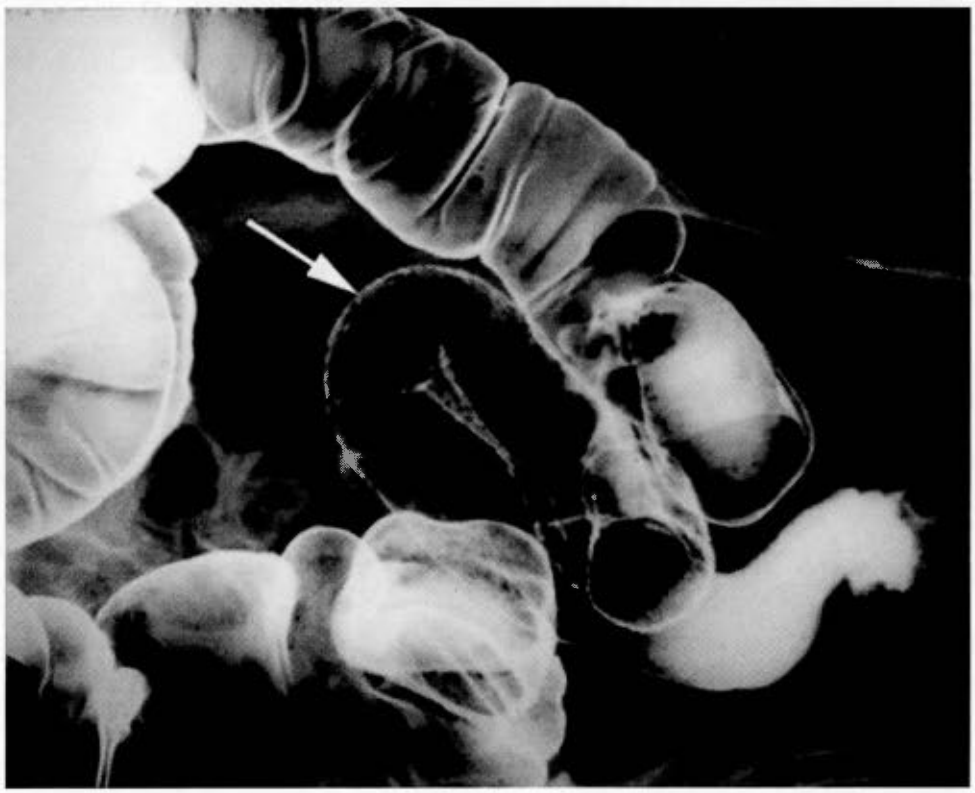


Figure 2.2 Radiographie d'un stade précoce de colite ulcéreuse, technique de énema double contraste. La flèche montre une section de l'intestin ayant un aspect granuleux mais sans ulcération (Ambrosini *et al.*, 2007).

Lorsque la suspension radio-opaque (le sulfate de baryum) est administrée seule, la granulosité et les plis sont plus difficiles à observer car tout le liquide se trouve au même endroit, augmentant l'effet écran. Le patient doit être tourné dans tous les sens, ce qui est très inconfortable. L'utilisation de la technique de double-contraste permet d'optimiser l'enrobage des intestins par la suspension. Elle consiste à administrer une autre substance (par exemple de l'air, de l'eau ou du mannitol) à la suite de la suspension de sulfate de baryum (Huprich et Fletcher, 2009) et peut être faite par voie orale (entérographie), anale (énéma) ou par cathéter (entéroclyse). Le déplacement laisse derrière lui un enrobage fin qui permet de distinguer les textures, ce qui est la clé de la technique (Dambha *et al.*, 2014). Le patient doit toutefois suivre une procédure inconfortable de lavage des intestins au préalable (Kohli et Maglinte, 2009).

Au besoin, le contraste avec les tissus sera amplifié à l'aide de l'administration d'un composé radio-opaque par voie intraveineuse. Pour cela, l'iode sous forme de complexe organique est utilisé et les tissus sont alors accentués. Surtout utilisée en tomographie pour détecter des manifestations intraluminales des maladies, l'injection intraveineuse est coûteuse et requiert une bonne expertise. Le pouvoir atténuant de l'iode est plus grand lorsque l'énergie des rayons X est plus basse. C'est pourquoi des solutions d'iode sont administrées oralement, par exemple en pédiatrie pour permettre d'opérer à basse énergie et ainsi réduire l'exposition (Leschka *et al.*, 2005).

Les RX permettent au radiologiste de facilement voir les premiers signes de l'apparition de la maladie. Ce type de méthode est souvent considéré comme la meilleure option en détection des MICIs à cause du faible coût et de la rapidité du processus. Il est possible de suivre l'évolution du traitement et la rémission seulement par l'observation précise des muqueuses, sans l'utilisation de la tomographie (Ghahremani *et al.*, 1982). Par contre pour les complications extraluminales, l'IRM devra être utilisée (Dambha *et al.*, 2014).

2.4.1 Le sulfate de baryum comme agent de contraste pour l'imagerie du tractus gastro-intestinal

Historique - Au moyen âge, le sulfate de baryum était connu par les alchimistes sous le nom de pierre de Bologne, et fut le premier matériel documenté montrant de la luminescence. Ce phénomène fut récement attribué à la présence de traces de cuivre dans le minerais de sulfate de baryum (Fromm, 2013). Le groupement sulfate du composé avait été identifié mais ce n'est qu'en 1808 que Sir Humphry Davy, le premier, sépara les ions de baryum. Avec la découverte des rayons X par Roentgen (1895), Walter Cannon fera des observations radioscopiques de l'intestin grêle chez un chat. Il publiera en 1904 un article où il utilise le sulfate de baryum en suspension pour tenter de différencier un désordre fonctionnel d'un désordre mécanique de l'estomac (Herlinger, 1999). Depuis, l'utilisation du SB ne fait que croître.

Utilisations – Le SB est un sel insoluble surtout utilisé comme remplissage pour augmenter la résistance mécanique des matériaux. Par exemple, il est incorporé dans le ciment pour les os afin d'améliorer les propriétés physiques comme la résistance à la cassure. L'acide polylactique est utilisé dans plusieurs applications biomédicales pour sa biodégradabilité et sa biocompatibilité mais il a une mauvaise résistance à la cassure et n'est pas visible aux rayons X. Dans le but de faire des matériaux résistants et radio-opaques pour des applications telles que le ciment pour les os, certains ont étudié l'effet du SB sur les propriétés mécaniques de l'acide polylactique. Le SB à une concentration de 10% augmente de 3338% la résistance de l'acide polylactique au test d'élongation jusqu'à la cassure, en plus de rendre l'implant visible aux RX (Martínez de Arenaza *et al.*, 2015). Cela serait dû aux propriétés innertes du SB qui augmentent la flexibilité car il ne forme pas de lien covalent avec la matrice. Le SB sert aussi au développement de vêtements et accessoires contre les radiations (Kim *et al.*, 2016). Le SB n'est pas dangereux pour le TGI dû à sa grande insolubilité qui le rend non biodisponible.

Commercialement, le SB est disponible sous une grande variété de suspensions et de pâtes mais très peu utilisé sous forme solide. Pour le diagnostic animal, des aliments solides avec du SB sont disponibles. Les suspensions commerciales sont constituées de SB extrait dans des mines et broyé. Les dimensions des particules obtenues sont de l'ordre du micron et ont la forme de cristaux irréguliers. Il est possible d'obtenir des particules nanométriques en synthétisant le SB à l'aide du chlorure de baryum et de l'acide sulfurique ou du sulfate d'ammonium (Adityawarman *et al.*, 2005; Bala *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 1996). Ces particules nanométriques seront davantage homogènes et plutôt arrondies (Barnett *et al.*, 2011). Des nanostructures intéressantes de sulfate de baryum comme des fibres (Li et Mann, 2000) et des cristaux auto-assemblés ayant des formes particulières (Judat et Kind, 2004) ont été produites. Il fut observé que la morphologie a un effet sur l'affinité avec les muqueuses et l'efficacité opacifiante. Par exemple, la forme en petits cristaux résultant du broyage du minerais minier adhère mieux aux muqueuses (Womack, 1984).

2.4.2 Le sulfate de baryum en suspension

Les concentrations sont très variées et la composition varie selon l'administration orale ou rectale. Plusieurs agents sont en effet ajoutés afin de stabiliser la suspension, la viscosité, la force ionique et la conservation de la suspension de SB.

Principe de la méthode - Les stades primaires des MICIs s'observeront sur la muqueuse intestinale par deux phénomènes distincts. L'apparition de l'inflammation rendra la paroi intestinale rigide et il y aura une diminution de la quantité de replis au niveau de l'intestin et du côlon. Puis, l'apparence lisse et unie de la muqueuse saine se transformera en motifs irréguliers 'rugueux'.

Pour observer ces manifestations, le double contraste avec le sulfate de baryum est souvent considéré comme l'outil de détection ultime non-invasif (il est possible de bien

voir par endoscopie mais c'est très invasif). Le double contraste consiste à déplacer la suspension de SB à l'aide d'un deuxième fluide (air, mannitol) et comporte 4 étapes principales : jeun, nettoyage des intestins, administration du premier médium (SB), administration du deuxième médium. Par exemple, en 2011, c'était la technique la plus utilisée au Royaume-Uni pour les diagnostics reliés à la maladie de Crohn (Zakeri et Pollok, 2016).

2.4.3 Administration de sulfate de baryum sous forme solide

L'utilisation du SB sous forme solide est moins courante. Toutefois, par la rapidité des prises de radiographies, le SB offre des possibilités de suivi très utiles, par exemple pour la détermination du temps de transit et du diamètre de l'œsophage.

2.4.3.1 Détermination du temps de transit

En 1965, afin de mesurer le temps de vidage de l'estomac, le SB fût granulé avec du sucrose et de l'acacia puis enrobé de phtalate-acétate de cellulose (Horton *et al.*, 1965). Les granules avaient des dimensions de 0,5 à 3 mm de diamètre et leur densité spécifique était la moitié de celle du SB (**figure 2.3**). Elles furent administrées dans un repas d'avoine bouillie. Il fut demandé au patient de ne pas mastiquer le mélange d'avoine et de granules.

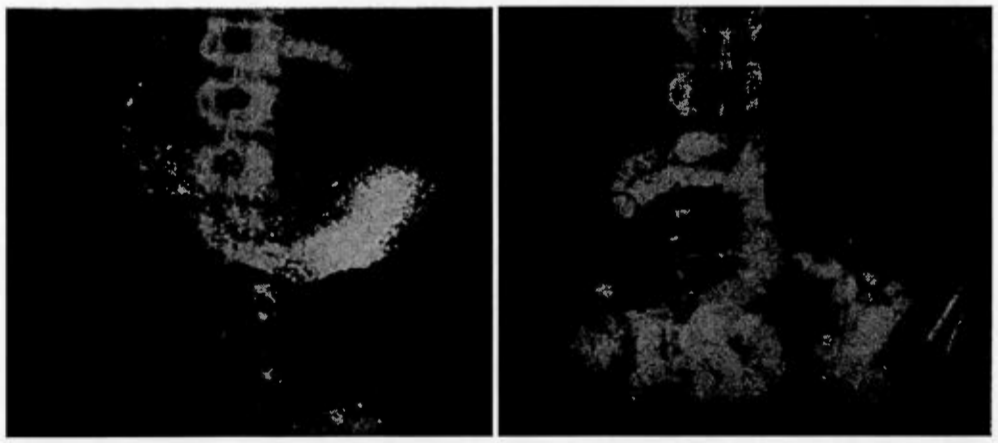


Figure 2.3 Administration de granules de sulfate de baryum. Gauche : prise de rayons X 4h après ingestion, les granules sont dans l'estomac. Droite : apparence lorsqu'elles se désintègrent dans l'intestin, sous l'effet du changement de pH (Horton *et al.*, 1965).

Les radiographies résultantes étaient très intéressantes. Dans l'estomac, le phtalate acétate de cellulose est insoluble au pH acide alors les granules gardent leur aspect et ne permettent pas de distinguer les détails des parrois mais au passage vers l'intestin, les granules sont dissoutes à cause du pH moins acide. Le phtalate acétate de céllulose devient soluble et l'aspect granulaire est perdu. Le fluide formé est homogène et il enrobe les muqueuses, permettant d'observer les plis mucosaux de la même manière que si une suspension liquide de SB avait été administrée.

L'administration de SB sous forme solide en même temps que des aliments pourrait être une stratégie à étudier. Cela pourrait permettre de diminuer les désavantages reliés aux suspensions de SB largement employées (grand volume, coûts).

2.4.4 Le sulfate de baryum pour le suivi de l'évolution des maladies

Les RX avec le SB permettent d'obtenir des bons résultats pour tous les stades : diagnostic, suivi, rémission. Les radiographies sont conservées dans le temps et

permettent de facilement comparer l'évolution d'un patient. La **figure 2.4** (Ghahremani *et al.*, 1982) montre le cas d'un patient souffrant de la maladie de Crohn avec le rétrécissement de l'œsophage.

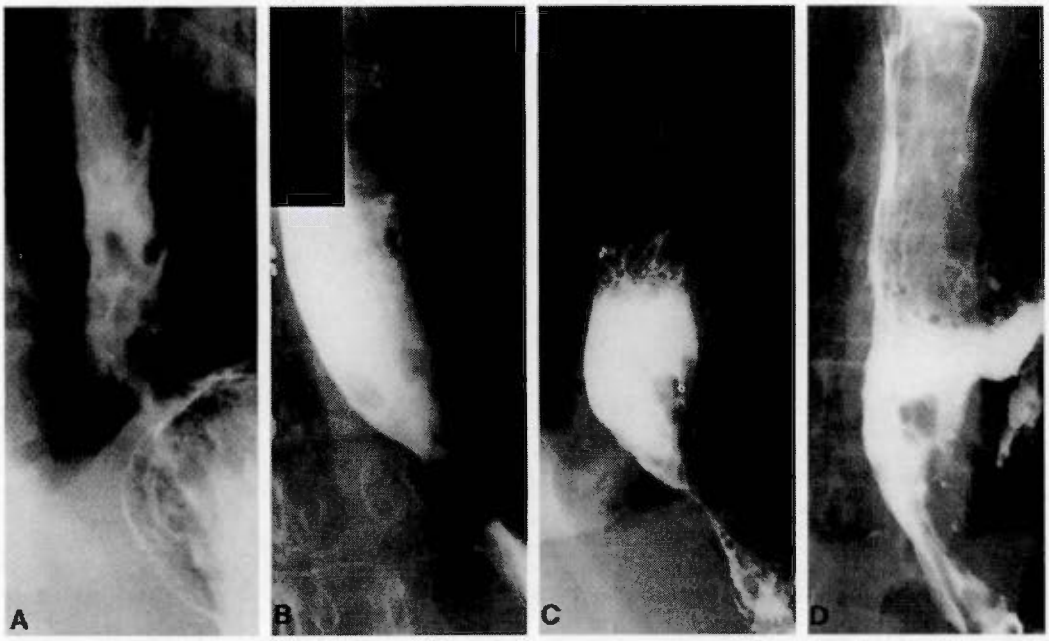


Figure 2.4 Suivi avec le sulfate de baryum de l'œsophage d'un patient avec la maladie de Crohn sur une période de 14 ans. A : présence de plis mucosaux ressemblant à des varices (1966). B et C : développement graduel d'un rétrécissment distal avec élargissement proximal (1970 et 1980). D : radiographie préopératoire (1980), montrant la formation de fistule (Ghahremani *et al.*, 1982).

Les radiographies s'étendent sur 14 ans et permettent facilement de voir dès le premier diagnostic des formations de petits filaments polypoïdes qui se sont tranquillement transformés en fistules (dernière photo, préopératoire). Le SB permet donc un bon suivi des maladies.

2.4.5 Le sulfate de baryum pour le diagnostic vétérinaire

Les chiens peuvent aussi être atteints d'entérocolite inflammatoire. Les manifestations des maladies observables dans le TGI seront sensiblement les mêmes que pour l'humain (rétrécissement, rugosité). La **figure 2.5** (Piper, 2012) montre l'épaississement mucosal typique des MICIs ainsi qu'une masse dans le côlon, possiblement un cas de cancer, chez un chien beagle.

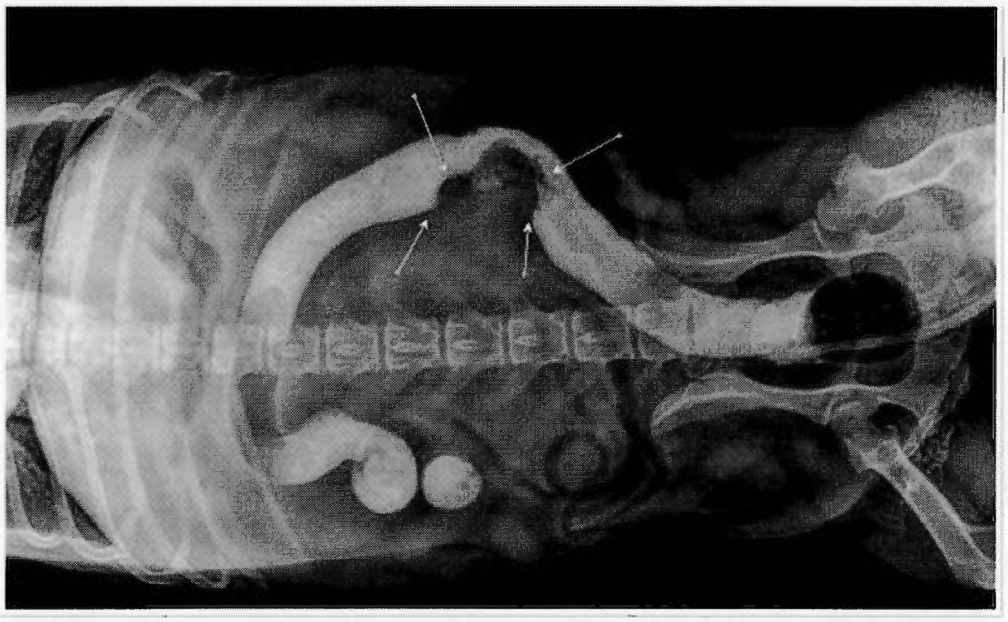


Figure 2.5 Le diagnostic par rayons X employant le sulfate de baryum dans un chien atteint d'une dysfonction intestinale. Épaississement de la muqueuse dû à l'inflammation et présence de masse, possiblement un cancer (Piper, 2012).

L'anatomie du chien ainsi que le volume et la longueur de son TGI permettent l'utilisation du SB d'une façon similaire à l'humain. Pour cela, et aussi car les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin se retrouvent chez les chiens, il pourrait être possible de faire un parralèle entre le TGI de la race canine et celui de l'humain. Les

chats pouvant aussi être atteints de MICI (Burke *et al.*, 2013), l'administration de SB est donc une pratique courrante chez les vétérinaires.

Les porcs pourraient aussi avoir un TGI qui s'approche de celui de l'humain (voir chapitre 1). Comme les suines sont relativement volumineux, le SB permet d'observer des défauts par exemple de l'œsophage (Raman *et al.*, 2015).

2.4.6 Suivi de formulation orale dans des modèles de chien

Comme le TGI canin n'est pas trop différent de celui de l'humain, les chiens sont de bons modèles pour les tests précliniques des formulations orales. La **figure 2.6** montre le suivi d'une formulation contenant le SB dans le TGI d'un chien beagle pour une étude d'enrobage (Yassin *et al.*, 2010). Le comprimé contient un noyau de 55 mg obtenu par compression directe et enrobé par compression directe de chitosan granulé. Dans le noyau, l'agent actif est remplacé par le sulfate de baryum (20 mg) pour permettre le suivi. L'analyse évalue la résistance jusqu'au côlon de différentes épaisseurs d'enrobage ainsi que la différence entre le chitosan en poudre et granulé. Ainsi, cette méthode est accessible et offre une simulation acceptable du TGI de l'humain.

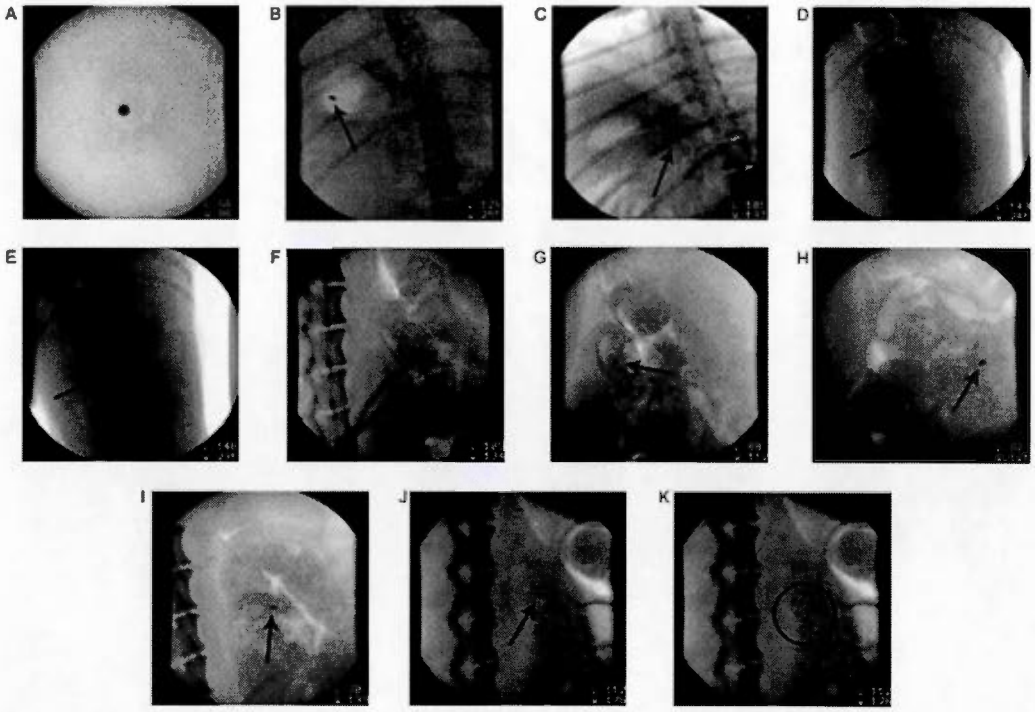


Figure 2.6 Suivi par rayons X d'un comprimé ciblant le côlon dans un chien beagle. A : le comprimé avant administration. B à K : radiographies prises de 1h à 10h après administration (Yassin *et al.*, 2010).

CHAPITRE III

LE CARBOXYMÉTHYLAMIDON COMME EXCIPIENT POUR LES FORMULATIONS ORALES

L'amidon est un biopolymère accessible et peu coûteux utilisé trouvant des applications dans divers domaines et dont la production était estimée à 85 millions de tonnes en 2015 (Khlestkin *et al.*, 2018) et la valeur du marché pour 2022 est estimée à 107 billions $US. Toutefois, il ne possède pas des bonnes propriétés mécaniques et physico-chimiques : il est peu soluble, cristallin, se compresse mal et se rétrograde après gélification (il reprend sa structure originale). La modification de l'amidon permet d'obtenir de nombreux matériaux aux propriétés améliorées et largement utilisés en alimentation, pharmacologie et dans le secteur des pâtes et papiers. Le marché de l'amidon modifié était estimé à 9 billions $US en 2015 et devrait atteindre 15 billions $US en 2024 (Grand View Research, 2018).

Récement, le carboxyméthylamidon fut utilisé comme matrice pour la fabrication de comprimés démontrant une protection gastrique, ciblant les intestins et contenant des molécules biologiques (Calinescu et Mateescu, 2008; Calinescu *et al.*, 2012; Calinescu *et al.*, 2005; Calinescu *et al.*, 2007). Ces découvertes montrent qu'il est possible d'obtenir des matériaux fonctionnalisés de sources naturelles trouvant des applications très intéressantes en pharmacie galénique. Pour bien saisir les possibilités qu'offrent l'amidon, sa structure sera vue en détails dans ce chapitre. Les prochaines sections résumeront les techniques principales de caractérisation de l'amidon natif, sa structure et ses applications. Les formes les plus utilisés d'amidons modifié et les principaux producteurs seront rapportés. Ensuite, les récents travaux sur la synthèse du CMA et

ses applications en pharmacologie seront discutés. Ce chapitre sera conclu par un résumé des méthodes de simulation du transit gastro-intestinal qui servent à tester les formulations orales et une présentation des méthodes habituelles d'imagerie pour le suivi *in vivo* des formulations.

3.1 L'amidon : structure, historique et caractéristiques

La structure de l'amidon est connue depuis plusieurs décennies. Le modèle de l'époque le plus représentatif était celui de Meyer en 1940 (**figure 3.1**) et est encore utilisé de nos jours.

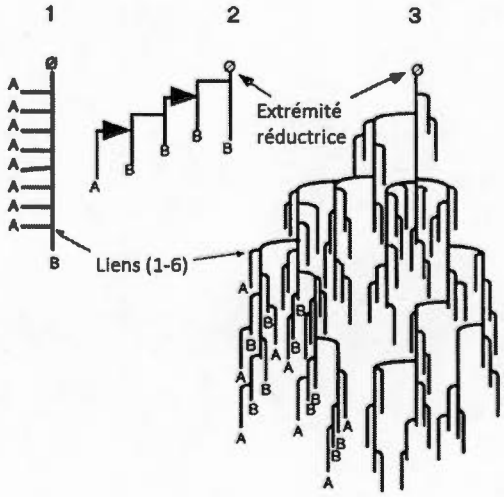


Figure 3.1 Historique des structures de l'amidon. 1) Staudinger, 1937; 2) Haworth, 1937; 3) Meyer, 1940. A : amylose terminal. B : amylose portant d'autre amylose. D'après (Buléon *et al.*, 1998).

L'amidon est composé de deux types de polymère de D-glucose, chacun ayant une seule extrémité réductrice. L'amylose compose en moyenne 30% de l'amidon mais varie beaucoup selon les sources et l'amidon à haute teneur en amylose en contient 70%. Les unités de glucose sont liées par polycondensation sur les carbones 1-4 via

liens éthers α-1,4-glycosidiques. La liaison orientée alpha (α) permet au polymère de glucose d'adopter une conformation hélice (contrairement à la cellulose, orientée β et qui est linéaire). L'amylopectine, 70% du grain d'amidon, possède des liaisons α-1,4 et α-1,6, ce qui forme tout de même des hélices mais avec des branches latérales.

Historiquement, l'analyse des grains d'amidon par diffraction des rayons X (DRX) a aidé à la compréhension de la structure. Les cercles du diffractogramme d'un grain d'amidon (**figure 3.2A**) sont constitués de plusieurs lignes plus minces. Ces lignes minces représentent la succession des sections cristallines et non-cristallines. Les régions cristallines sont en fait les régions denses en hélices, tandis que les régions non-cristallines sont les embranchements, au début des hélices (**figure 3.2B**).

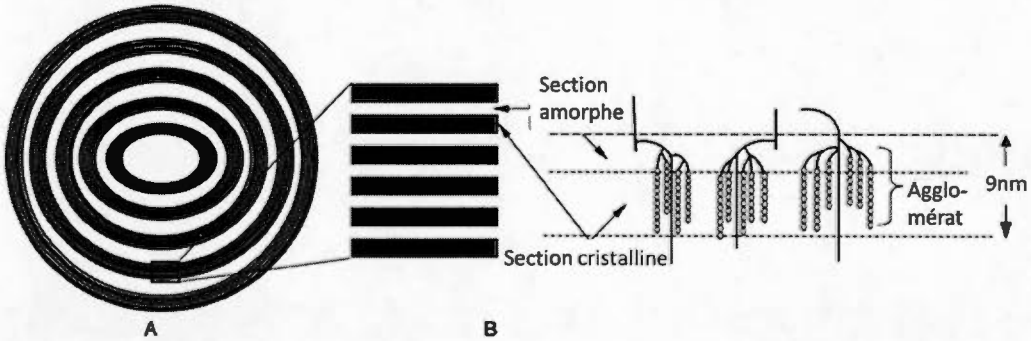


Figure 3.2 Relation entre la structure des grains d'amidon et le diffractogramme. A : diffractogramme d'un grain d'amidon. B : illustration des parties amorphes (branchées) et cristallines (hélices) dont la succession forme des lamelles. L'orientation des hélices du centre vers la surface se nomme radiale. Adaptation d'après (Tester *et al.*, 2004).

Les dimensions impliquées dans les sous-structures de l'amidon sont multiples. Les unités glucosidiques forment des hélices d'amylose qui à leur tour sont regroupées sur l'amylopectine (**figure 3.3**). Finalement, les amylopectines sont regroupées en grain d'amidon, les hélices orientées vers l'extérieur du grain avec des amyloses libres un peu partout. La **figure 3.3D** montre aussi deux différents modèles d'organisation de

l'amylopectine. Dans le modèle en grappe, la chaîne principale est radiale comme les amyloses mais dans le modèle 'building bloc', la chaîne principale est axiale.

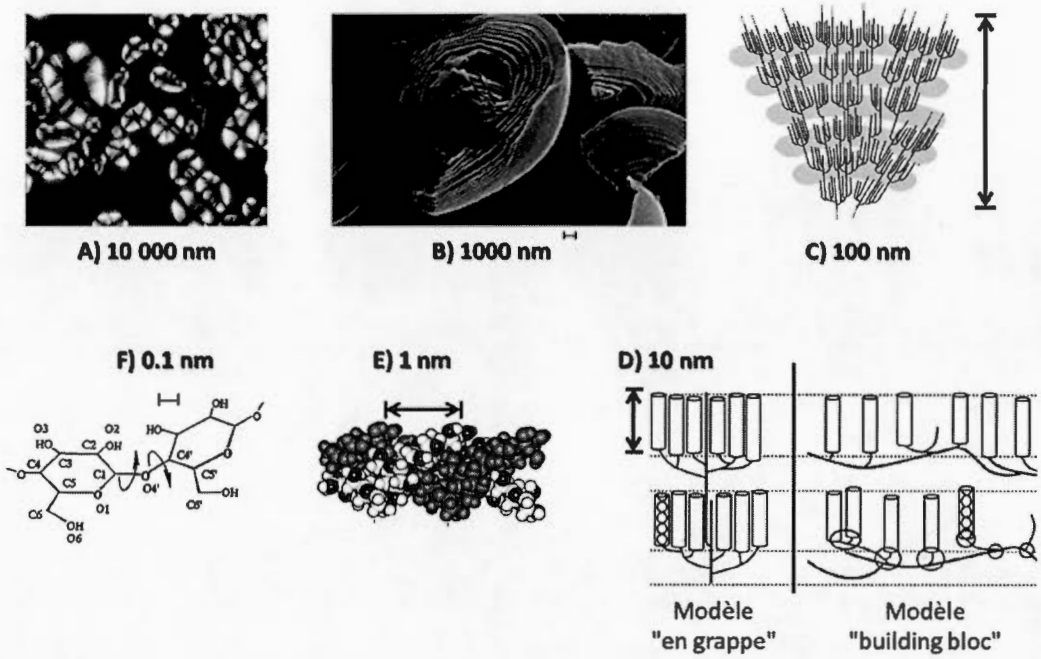


Figure 3.3 Comparaison des dimensions des différents niveaux structuraux de l'amidon. Les grains d'amidons mesurent entre 1 et 100 µm. Il est composé de couches successives amorphes et cristallines de 9-10 nm. Le monomère de glucose mesure 0,55 nm. Adaptation d'après (Bertoft, 2017; Coultate, 2009; Hancock et Tarbet, 2000; Malumba *et al.*, 2017).

L'orientation des unités dans le grain d'amidon suit un ordre précis qui relève de la biosynthèse. Les liens α-1,4 sont formés par les enzymes amidon synthases (voir EC 2.4.1.21). Des enzymes de branchement prennent ensuite le relais pour former des liaisons α-1,6. Aussi, des enzymes de débranchement vont possiblement réorganiser la structure au besoin (Jeon, J. S. *et al.*, 2010). La durée des jours et des nuits ainsi que les précipitations de pluie vont influencer la longueur de chaque segment. La **figure 3.4** montre un modèle schématique de mégastructure de l'amidon.

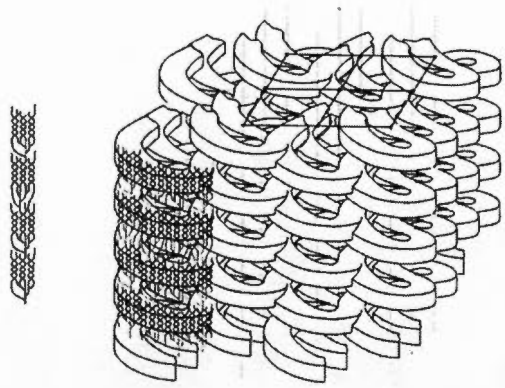


Figure 3.4 Schéma de l'amidon de pomme de terre organisé en super-hélices (Oostergetel et van Bruggen, 1993).

La DRX a aussi permis de constater que les hélices peuvent adopter plusieurs conformations (**figure 3.5**). L'arrangement cristallin de l'amidon dépendent surtout (mais pas seulement) du taux d'hydratation. Dans la nature les hélices sont organisées principalement en double-hélices gauches.

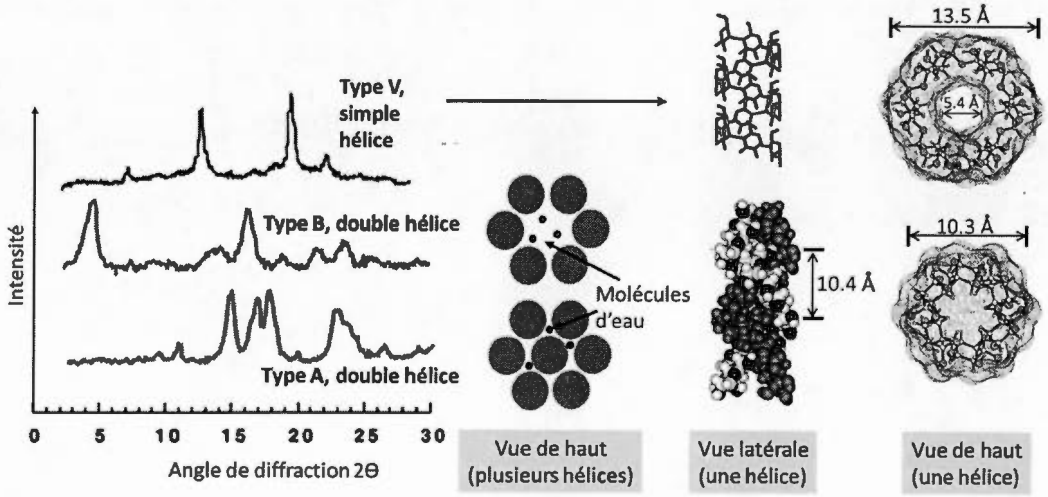


Figure 3.5 Comparaison des diffractogrammes en rayons X de différents types d'hélices d'amylose. Type A : maïs, riz. Type B : pomme de terre. Le type B peut accommoder des molécules d'eau dans le canal du centre tandis que dans le type A l'eau s'intercale entre les hélices. Adaptation d'après (Buléon *et al.*, 1998; Hancock et Tarbet, 2000; Tester *et al.*, 2004).

Le cristal double-hélices de l'amidon type A possède un type de maille compacte et la maille de l'amidon type B possède un canal libre pouvant contenir de l'eau. Plusieurs sources d'amidon contiennent un mélange de deux types. Le type A est plus dense il y a moins de place pour l'eau que dans le type B. Le type B est observé dans la pomme de terre, laquelle possède d'ailleurs une très faible densité (**tableau 3.1**). Les simples hélices (type V) sont difficilement observées parce qu'elles sont dispersées dans la structure (Buléon *et al.*, 1998). L'hélice type V est plus large que les doubles-hélices; c'est cette forme qui est adoptée lorsqu'il y a inclusion d'une molécule dans le canal intérieur, notamment en présence de lipides (les céréales comme l'avoine contiennent des lipides). Il fut rapporté que l'amidon de type A possède des ramifications un peu partout, tandis que les ramifications du type B sont plus regroupées (Jane *et al.*, 1997).

Tableau 3.1 Caractéristiques de différents amidons. Adaptation d'après (Teh *et al.*, 2014).

Source	Potentiel Zêta (ζ) en solution	pH en solution après autoclave	Contenu en amylose (%)	Densité g/mol/nm^3
Riz	-2.09	7.55	20.5	13.7
Blé	-2.00	6.49	25.8	11.3
Maïs	-0.47	4.88	22.5	16.1
Pomme de terre	-3.47	5.59	16.9	3.8

Le ratio amylose: amylopectine sera influencé par la source. Par exemple, le pourcentage d'amylose peut varier de 1 à 73% (Buléon *et al.*, 1998). Les différentes sources d'amidon dans la nature sont les tubercules (i.e. les pommes de terre), les céréales (i.e. riz, blé, maïs), les légumes (i.e. petits pois) et les racines (i.e. tapioca). Ils ont tous des caractéristiques différentes (voir le **tableau 3.1**) comme le pH et la densité (Teh *et al.*, 2014). Le potentiel zêta mesure les charges en surface des particules dans une suspension ou un colloïde (Retamal Marín *et al.*, 2017). L'amidon de pomme de terre a le plus bas potentiel zêta à cause de la présence de groupes phosphate liés (Teh

et al., 2014). C'est un des amidons avec la plus grande teneur en phosphate (0.06-0.10%). La longueur des chaînes d'amylose et la masse moléculaire des amylopectines varient aussi entre les types d'amidons et ont un impact sur la température de gélatinisation. Les chaînes plus courtes gélatinisent à une température plus basse et les chaînes longues créent une résistance à la gélatinisation (Jeon, J. S. *et al.*, 2010).

Leurs aspects morphologiques (**figure 3.6**) montrent que l'amidon de maïs (en **c**) exprime une cristallinité intermédiaire (Choy *et al.*, 2016). La faible densité de l'amidon de pomme de terre, due aux chaînes d'amylopectine 25% plus grandes que la moyenne, et sa structure de type B se reflètent dans sa forme gonflée (**figure 3.6d**).

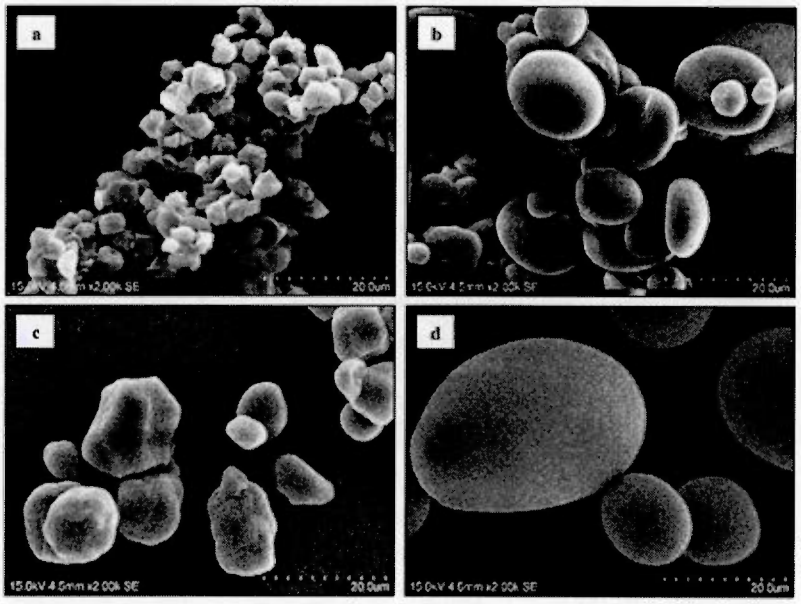


Figure 3.6 Microscopie électronique à balayage de différents amidons. a) Amidon de riz, b) amidon de blé, c) amidon de maïs et d) amidon de pomme de terre (Choy *et al.*, 2016).

Le ratio amylose/amylopectine de l'amidon influencera la réactivité et les propriétés comme la cristallinité et la viscosité. Les amidons à haute teneur en amylose (*high-amylose starch, HAS*) sont moins visqueux et plus faciles à manipuler.

L'amidon a des propriétés qui évoluent avec son environnement. Ainsi, la caractérisation doit être minutieusement préparée pour obtenir des résultats reproductibles. Par exemple, les conditions de gélatinisation peuvent faire varier les mesures des propriétés physiques comme le rayon de giration et la masse moléculaire moyenne créant des ambigüités dans la littérature (Buléon *et al.*, 1998).

L'hydrolyse enzymatique a aussi ouvert de nouvelles voies dans l'élucidation des structures de l'amidon. (**figure 3.3B**). Par exemple, la proportion branchée de l'amidon est déterminée par la β-amylase. Son site actif est sous forme de puits où ne peuvent pénétrer seulement que les extrémités non réductrices des chaînes (Buchholz et Seibel, 2008). Sous l'action de β-amylase, les chaînes linéaires des extrémités sont transformées en maltose tandis que les chaînes ramifiées forment des dextrines. Ces résidus peuvent être séparé et quantifié par chromatographie d'exclusion moléculaire (Bertoft, 2017).

3.2 L'amylose type V : conformation, hydrophobicité et complexe d'inclusion

L'amylose peut adopter différentes conformations : hélices double (A ou B, selon l'organisation) ou simple (V). L'inclusion d'une molécule dans le canal d'une hélice simple type V forme un complexe d'inclusion et la nature de la molécule incluse influencera le nombre d'unités par tour (6 unités : V_6, 8 unités : V_8) et l'espacement des hélices, par exemple V_{6I} si elle est seulement dans l'hélice, V_{6II} et V_{6III} lorsqu'elle se place aussi à l'extérieur (Cohen *et al.*, 2008).

La **figure 3.3F** (Hancock et Tarbet, 2000) montre la structure en hélice de l'amylose qui résulte de l'angle des liaisons α-1,4 des unités glycosidiques. Pour l'amylose de type V (hélice simple), les hydrogènes aliphatiques et les oxygènes des liens éther glycosidique sont exposés à l'intérieur de l'hélice, créant une région hydrophobe et lipophile (**figure 3.7**). Pour les hélices de type A et B, le pas d'hélice est plus grand,

l'angle est différent et les régions hydrophobes sont dispersées. C'est pourquoi les complexes d'inclusion sont observés sur la forme V.

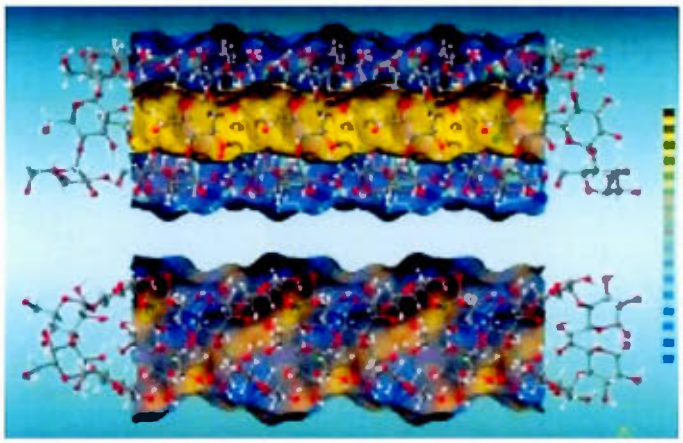


Figure 3.7 Topographie des régions hydrophobiques de l'amylose. En bleu : hydrophile, jaune : hydrophobe. Haut : simple hélice type V. Bas : double-hélice gauche, type A (Immel et Lichtenthaler, 2000).

Les différentes conformations adoptées dépendent des liens hydrogène présents, lesquels sont influencés par plusieurs facteurs, entre autre le solvant, le pH et la température. La **figure 3.8** montre l'influence de la fraction aqueuse sur les liens hydrogène de l'amylose dans un solvant aprotique (dans ce cas le diméthylesulfoxyde, DMSO). La conformation en hélice est surtout due aux liens hydrogène entre unités de glucose voisines.

L'amidon peut inclure l'iode à l'intérieur de ses hélices, cela fut confirmé en RMN ^{13}C par le déplacement plus grand de C-1 et C-4 par rapport à C-2, C-3 et C-6 (Jane *et al.*, 1985). Peu après, les déplacements du carbone en RMN ont été corrélés avec les angles de torsion et la conformation pour des hélices avec 6, 7 ou 8 glucoses par tour (Gidley et Bociek, 1988). La RMN ^{13}C permet aussi de trouver le degré de substitution, le ratio d'amylose à l'aide de standards et de suivre la réticulation (Dunn et Krueger, 1999). Le déplacement de C-1 et C-4 en RMN du carbone est dû au fait que ce sont ces

carbones qui portent les oxygènes (les liens éther du squelette). Ce sont ces oxygènes qui pourront s'impliquer dans une complexation avec une molécule incluse.

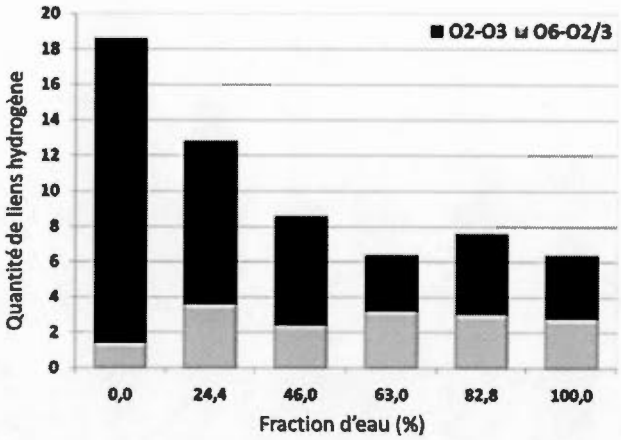


Figure 3.8 L'intensité de liens hydrogène de l'amylose selon le type de solvant. Noir : lien hydrogène avec un glucose inter-tour (non voisin). Gris : liens hydrogène voisins (intra-tour). En absence de solvant protique (0% d'eau), les liens avec les glucoses non-voisins deviennent plus nombreux et forment la structure en hélice type V (Tusch *et al.*, 2011).

3.3 Formes d'amidon modifié

Ainsi la modification se fait souvent sur l'amidon à haute teneur en amylose (Hylon VII®), à base d'amidon de maïs mais il existe d'autres sources comme l'amidon de pois (Heinze et Koschella, 2005).

Il existe beaucoup de procédés différents pour modifier l'amidon. Le chauffage en solution, une méthode classique, gélatinise l'amidon, améliorant entre autre sa digestibilité et sa solubilité mais peut aussi réduire le poids moléculaire. L'oxydation peut modifier l'amidon physiquement par hydrolyse et chimiquement par la formation de groupements carbonyles et carboxyles (Khlestkin *et al.*, 2018). La réticulation est effectuée chimiquement à l'aide de l'épichlorhydrine ou de phosphates en solution mais peut aussi être réalisée physiquement selon des procédés plus 'verts' : par

exposition à différents plasmas (Zhu, F., 2017), par irradiation (Pant *et al.*, 2010) ou par les champs électriques qui pourraient aussi permettre l'hydrolyse et la substitution (Zhu, Fan, 2018).

La greffe de différents groupements permet aussi la fonctionnalisation de l'amidon selon différents besoins (Wu, H. *et al.*, 2016)). La modification de l'amidon à l'aide d'enzymes peut s'avérer rapide simple et rentable. La dépolymérisation par les amylases est la réaction la plus connue. L'amidon débranché, prometteur en formulation et pour les nanomatériaux, a des propriétés d'auto-assemblage et est obtenu par réaction enzymatique avec la pullulanase ou l'isoamylase (Liu, G. *et al.*, 2017).

L'amidon modifié pour usage pharmaceutique est produit par plusieurs grandes compagnies et s'adapte aux différentes techniques telles l'encapsulation, la compression directe et la granulation sèche ou humide. L'amidon partiellement pré-gélatinisé Starch 1500®, produit par Colorcon, est fait d'amidon de maïs et sert de liant, désintégrant et lubrifiant.

DFE Pharma ont plusieurs produits. Prejel PA5 PH est un amidon complètement pré-gélatinisé agissant comme liant et augmentant la dureté des comprimés. SuperStarch® 200 est partiellement pré-gélatinisé et peut servir de liant, de désintégrant, de lubrifiant ou pour améliorer l'écoulement des mélanges de poudre. Primojel® est un superdésintégrant dont la réticulation et la substitution diminuent fortement la rétrogradation et permettent une meilleur stabilité des comprimés.

Le glycolate d'amidon sodique, un désintégrant puissant pour les formulations, est commercialisé sous plusieurs marques connues telles Explotab® et Vivastar® de JRS Pharma. Roquette Frères, dans le domaine de l'amidon depuis 1933, sont des grands producteurs mondiaux avec des marques comme Glycolys® qui sont disponibles en différents grades selon les besoins de formulation.

3.3.1 L'amidon réticulé

La recherche sur la modification de l'amidon au laboratoire du professeur Mateescu peut être appréciée selon une évolution dans le temps. La réticulation de l'amidon avec l'épichlorhydrine a ouvert certaines voies pour le domaine, à commencer par le relargage contrôlé de médicaments à partir de comprimés d'amylose réticulé (Lenaerts *et al.*, 1991). La réticulation se fait à 60°C dans une solution basique. Après neutralisation, le produit est précipité et lavé avec l'acétone. Le temps de relargage de l'actif a une dépendance non monotone avec le degré de réticulation faisant de l'amidon réticulé un excipient aux propriétés modulables. Un brevet fut déposé (Mateescu *et al.*, 1995) et la technologie enregistrée sou le nom Contramid®. C'est un amidon (à haute teneur en amylose) faiblement réticulé et qui permet la libération lente de certains agents actifs (Mateescu *et al.*, 1995; Ravenelle et Rahmouni, 2006). Lorsque l'amidon est hautement réticulé, il agit comme liant et désintégrant et fut enregistré sous le nom de Liamid® (Cartilier *et al.*, 1997).

Les modifications structurales de l'amidon ont ensuite été observées par spectroscopie infrarouge (FTIR) et diffraction des RX (DRX) permettant de constater que la réticulation diminuait la cristallinité (Dumoulin *et al.*, 1998). Alors, des formulations à base d'amidon réticulé ont été comparées *in vivo* avec succès à des dosages commerciaux de Voltaren® (diclofénac) et Effidac® (Lenaerts *et al.*, 1998). Une relation entre le degré de réticulation et la vitesse de libération fut alors observée par DRX (**figure 3.9**).

Différents groupes substituants permettent de moduler la libération du composé actif. Les groupes substituants aminoéthyle, carboxyméthyle et acétate ont montré des résultats concluants lors des simulations *in vitro* incorporant l'acétaminophène, l'acide acétylsalicylique et la metformine comme modèles (Mulhbacher *et al.*, 2001).

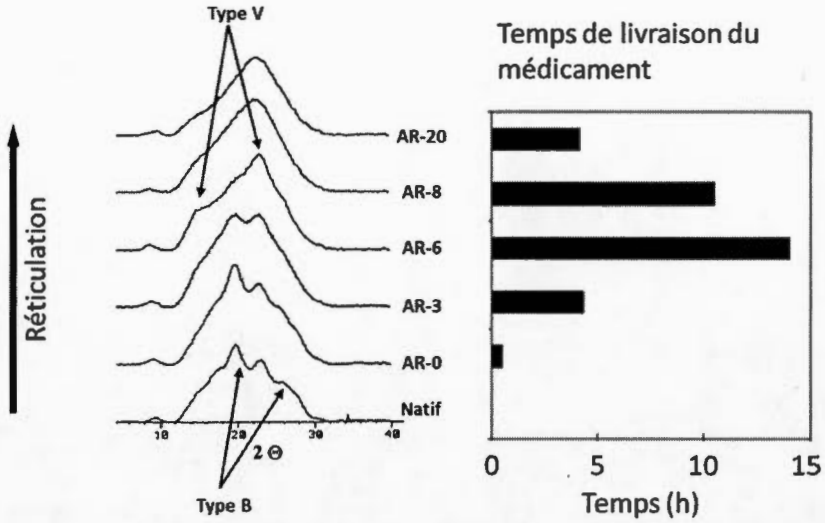


Figure 3.9 Relation entre la cristallinité, le degré de réticulation et le temps de libération des composés actifs pour des comprimés d'amylose réticulé. AR : amidon réticulé. En augmentant la réticulation, la quantité d'hélices simples augmente et permet la modulation du temps de libération (Ispas-Szabo *et al.*, 2000).

Il fut ensuite observé que ces mêmes substituants avaient un impact sur le gonflement du comprimé (Mulhbacher *et al.*, 2004) et sur la diffusion du composé actif (Mulhbacher et Mateescu, 2005). L'amidon réticulé devient alors une propriété intellectuelle de Labopharm. Le carboxyméthylamidon réticulé était déjà connu comme désintégrant. Grâce aux bonne propriétés matricielles de l'amidon à haute teneur en amylose de Contramid, Labopharm mit sur le marché une formulation à prise unique de Tramadol (un opioid analgésique analogue à la codéine) permettant une libération rapide et prolongée pour 24h, commercialisée dans plus d'une dizaine de pays : Tradazol®.

Les recherches au laboratoire Mateescu ont donc été concentrées sur le carboxyméthylamidon (non réticulé), qui semblait à priori offrir des propriétés similaires mais, comme le démontreront les prochaines sections, qui s'avérera bien plus versatile.

À part les exemples précédement cités et les produits commerciaux désintégrants, l'amidon réticulé a aussi été utilisé pour obtenir des micro-sphères (Fang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2018; Wojtasz *et al.*, 2016), comme remplissage de capsule pour une livraison controllée (Cury, B. S. *et al.*, 2009; Cury, B. S. F. *et al.*, 2009), des nanoparticules à libération modulable (Saikia *et al.*, 2016) et peut être associé avec des protéines pour former des micro-capsules (Larionova, 1999). La réticulation a aussi été étudiée par extrusion, démontrant des propriétés de relargage prolongé (O'Brien *et al.*, 2009), et l'amidon réticulé peut être associé avec la pectine et l'ingrédient actif pour former des microparticules pour la libération controllée (Soares *et al.*, 2013).

3.3.2 Le carboxyméthylamidon

Le CMA (en anglais *carboxymethylstarch : CMS*, ou *CM-HAS*) peut parfois être nommé glycolate sodique d'amidon (*sodium starch glycolate*) comme le produit commercial qui est sous forme de sel, hautement substitué et qui agit comme désintégrant pour les formulations orales. Cela augmente toutefois la confusion au niveau des recherches dans les périodiques.

La synthèse de Williamson (1850), nommée selon son découvreur, permet d'otenir des éthers en réagissant des alkoxydes avec des composés ayant un carbone halogéné. Cela consiste d'abord à former la base conjuguée des fonctions alcool de l'amidon en présence d'hydroxyde de sodium. Les alkoxydes formés seront de bons nucléophiles pour attaquer le carbone porteur de l'halogène selon un mécanisme nommé 'substitution nucléophile de type 2', le chlore étant un bon groupe partant (Misman *et al.*, 2015). Il est rapporté que le rapport base:réactif pourrait influencer le rendement car ils réagissent entre eux (Sangseethong *et al.*, 2015).

La réaction est effectuée en milieu aqueux pour permettre aux chaînes d'amylose de s'ouvrir par bris des ponts hydrogène. La carboxyméthylation peut ainsi être obtenue

sur toute la structure de l'amidon. Si la réaction est effectuée dans un solvant organique comme l'éthanol, la solubilité de l'amidon est réduite et la réaction devrait avoir lieu surtout en surface des grains. Il est possible d'obtenir un produit relativement sécuritaire par la synthèse de Williamson car les impuretés peuvent être éliminées par lavage eau/méthanol et elle ne fait pas usage de catalyseur, lesquels sont souvent problèmatiques à éliminer.

Différentes applications ont été trouvées pour CMA mais plus particulièrement, il est bien utile pour la conception des comprimés. Il permet la modulation de la libération des composés actifs par la complexation avec la lécithine (Friciu *et al.*, 2013), la variation du degré de substitution (Lemieux *et al.*, 2009), du degré de protonation (Assaad et Mateescu, 2010), et en utilisant différentes méthodes de séchage (Lemieux *et al.*, 2010) et l'association avec d'autres excipients comme le chitosane (CHI) par nébulisateur (anglais : *spray-dryer*) ou co-précipitation (Assaad *et al.*, 2011). Tout cela permettant une modulation '*chrono-delivery*' (Ispas-Szabo *et al.*, 2016).

Le CMA s'applique aussi au transport et à la protection gastrique de molécules biologiques. Il a été utilisé comme matrice pour le transport de bactéries *Escherichia coli* (Calinescu *et al.*, 2005). Le CMA a servi de matrice pour incorporer le peptide F4 *Fimbriae*, proposé comme vaccin oral porcin contre la souche entérotoxygénique *Escherichia coli* (Calinescu *et al.*, 2007). Ce projet a mené à des tests pré-cliniques sur des porcs (Delisle *et al.*, 2012). Toujours pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales, le CMA a transporté des probiotiques (*i.e. Lactobacillus rhamnosus*) pour augmenter la flore intestinale (Calinescu et Mateescu, 2008), ainsi que l'enzyme diamine oxydase pour réduire l'inflammation (Calinescu *et al.*, 2012). Pour le traitement de la pancréatite, le CMA a servi a protéger et transporter des enzymes pancréatiques (Massicotte *et al.*, 2008). C'est donc un excipient qui s'adapte bien au transport vers les intestins.

3.3.2.1 Histoire et autres applications

L'amidon natif a plusieurs avantages comme la disponibilité et le faible coût, mais sa mauvaise solubilité a des répercussions problématiques. Par exemple, la viscosité est difficile à contrôler, il est insoluble dans l'eau froide et les gels craquent, ce qui limite les applications potentielles. Il est donc plus souvent utilisé sous forme d'amidon pré-gélatinisé. La carboxyméthylation permet aussi d'augmenter la solubilité de l'amidon. Le carboxyméthylamidon étant soluble dans l'eau froide, il devient utile dans plusieurs domaines (**tableau 3.2**). Il trouve aussi des applications en tant qu'adhésif pour le bois (Zhang, Y. et Lixia, 2014), épaississant de fluides de forage (Minaev *et al.*, 2016), liant de céramiques (Ju *et al.*, 2008), électrolyte pour électrode (Wang *et al.*, 2017) et inhibiteur de corrosion (Wu, W. *et al.*, 2016).

Tableau 3.2 Applications du carboxyméthylamidon. Adaptation d'après (Zhang, D. F. *et al.*, 2003).

Domaine	Propriétés	Détails
Textiles	Pénétrabilité, fluidité	Remplace le CMC
Pâtes et papiers	Se lie avec cellulose	Groupes hydroxyle
Lavage	Chélation	Pour les saletés et les métaux
Sanitaire, cosmétiques	Absorbe l'eau	Absorption de fluides
Pharmacie	Gonfle	Le vrac peut gonfler jusqu'à 30x
Alimentation	Stabilisant Préservatif/emballage	Émulsions, suspensions Viandes, végétaux
Traitement des eaux	Complexation	Métaux lourds, interactions électrostatiques du COO^-
Adhésif	Viscosité	Cohésion avec les fibres

Le CMA fut synthétisé la première fois en 1924 par réaction de l'amidon avec le chloroacétate de sodium en solution alcaline (Zhang, D. F. *et al.*, 2003). En solution aqueuse, la graine d'amidon se gélatinise, ce qui modifie les propriétés. C'est pourquoi la synthèse fut effectuée dans le méthanol (Schrodt, 1942) puis dans l'éthanol (Sloan

et al., 1962). L'utilisation d'un solvant organique a plusieurs avantages : I) maintient la structure granulaire de l'amidon, II) facilite l'élimination des sous-produits et III) permet d'obtenir un degré de substitution plus grand que 1.

La réaction a aussi été portée dans une extrudeuse à double vis (Bhandari et Hanna, 2011). Pour obtenir de hauts degrés de substitution (DS), la réaction peut être effectuée dans un milieu organique comme *i*-propanol ou le diméthylesulfoxide (DMSO) et répétée au besoin. Par exemple, dans un système méthanol : eau, après 10 répétitions, il est possible de se rendre à un DS de 2,35. Le CMA avec haut DS trouve des applications dans le textile comme remplissant (*filler*) pour le papier et dans l'imprimerie comme épaississant pour l'encre (Mostafa et Morsy, 2004; Ragheb *et al.*, 1997).

La distribution des substitutions sur les 3 sites (O_{C2}, O_{C3} ou O_{C6}) dépend de plusieurs facteurs, notamment le type d'amidon et le solvant. Des synthèses ayant le même temps et température de réaction sont comparées au **tableau 3.3.** Selon ces méthodes, le O_{C3} est le moins substitué. L'amidon à haute teneur en amylose a les plus hauts degrés de substitution (DS) et l'amidon cireux (faible teneur en amylose) est moins substitué. Les DS y sont aussi comparés par RMN ^{1}H (résonance magnétique nucléaire du proton). Le solvant influence la solubilité du produit final et la réaction dans l'*i*-propanol donne un CMA moins soluble que la modification dans le DMSO ou l'eau (Heinze et Koschella, 2005).

La modification de l'amidon comporte donc plusieurs aspects importants : température, temps, pH, agitation, type de solvant (polarité, protique/aprotique), forme du réactif (sel ou acide), ratio amidon: réactif et type d'amidon. Ces paramètres influenceront le produit final de différentes façons : solubilité, viscosité, rendement, degré de substitution (et site de substitution), densité (compressibilité) et humidité (cristallinité et type d'hélice).

Tableau 3.3 Distribution des sites de substitution sur le carboxyméthylamidon dans des solvants organiques avec différents amidons. Les synthèses utilisent le même procédé par rapport au temps, à la température et à la quantité de réactifs. Adaptation d'après (Heinze et Koschella, 2005).

Type d'amidon	Solvant réactionnel	DS (RMN ^{1}H)				DS (HPLC)
		O_{C2}	O_{C3}	O_{C6}	Total	Total
Blé	*i*-Propanol	0,87	0,12	0,67	**1,66**	**1,40**
	Éthanol	0,10	0,02	0,09	**0,21**	**0,15**
	Méthanol	0,14	0,03	0,08	**0,25**	**0,13**
Maïs cirreux	*i*-Propanol	0,62	0,14	0,53	**1,29**	**1,29**
	Éthanol	0,65	0,11	0,32	**1,08**	**0,95**
	Méthanol	0,08	0,02	0,06	**0,16**	**0,08**
Maïs 70% amylose	*i*-Propanol	0,83	0,15	0,69	**1,67**	**1,40**
	Éthanol	0,83	0,15	0,40	**1,38**	**1,29**
	Méthanol	0,20	0,05	0,10	**0,35**	**0,18**

3.3.2.2 Caractérisation du carboxyméthylamidon

La spectroscopie infrarouge permet de valider la carboxyméthylation. Avec l'ajout des groupements carboxyles, de nouveaux pics apparaissent entre 1400 cm^{-1} et 1800 cm^{-1}. Sous forme de sel, le carboxylate montre un pic vers 1603 cm^{-1} correspondant à l'élongation antisymmétrique. Le pic de l'élongation symmétrique se trouve à 1417 cm^{-1} et chevauche un pic structural. Ce pic est moins prononcé lorsque le carboxyméthylamidon (CMA) est protonné mais il ne se déplace pas. Le pic à 1603 cm^{-1} du carboxylate se déplace vers 1735 cm^{-1} lorsque le CMA est protonné (Assaad et Mateescu, 2010). Ainsi, l'apparition de ces pics permet de déterminer si le groupement greffé est présent mais aussi de différencier la forme sel de protonnée.

Quoique plutôt rare, certains ont réussi à déterminer un modèle permettant de déduire le DS par FTIR (Liu, J. *et al.*, 2012). Il est plus commun de trouver le DS par titration (Calinescu *et al.*, 2005) mais parfois aussi par HPLC ou RMN (Lazik *et al.*, 2002).

Toutes les autres techniques sont utilisées de la même manière que pour l'amidon. Le potentiel zêta détermine les charges des colloïdes et des particules en suspension dont les tailles peuvent être analysées par diffusion de la lumière (Teh *et al.*, 2014). La DRX permet d'observer la cristallinité (voir la **figure 3.5**) et la microscopie électronique à balayage (MEB) montre les structures macroscopiques. L'enthalpie de gélatinisation et la comparaison des zones amorphes peuvent être analysées par calorimétrie différentielle à balayage (*differential scanning calorimetry: DSC*). La thermogravimétrie (*thermogravimetric analysis: TGA*) permet de déterminer le contenu en eau et les résidus inorganiques (Spychaj *et al.*, 2013). La viscosité peut être mesurée de plusieurs façons et les propriétés filmogènes sont représentées par la résistance à l'élongation et la perméabilité à divers fluides (Mostafa et Morsy, 2004). Selon les applications, la biodégradabilité, la digestibilité *in vivo*, la densité, la compressibilité, la conductivité, le contenu en eau, le degré de polymérisation, le ratio amylose/amylopectine et la capacité d'absorption sont d'autres paramètres intéressants qui peuvent contribuer à la caractérisation de l'amidon (Spychaj *et al.*, 2013).

3.4 Caractérisation et suivi des formulations orales

Pour analyser les propriétés d'un excipient comme matrice, une méthode simple consiste à varier le type de composé actif selon la perméabilité et la solubilité. Selon le système de classification biopharmaceutique (*biopharmaceutical classification system: BCS),* les composés actifs sont classés en quatre catégories: classe 1 (haute solubilité, haute perméabilité), classe 2 (basse solubilité, haute perméabilité), classe 3 (haute solubilité, basse perméabilité) et classe 4 (basse solubilité, basse perméabilité). Les modèles classiques sont l'aspirine (classe 1), le diclofénac (classe 2), l'acétaminophène (classe 3) et par exemple, furosémide (classe 4) . Pour formuler un composé actif, le type de matrice est choisi selon sa structure (neutre, chargée, hydrophile) et sa fonction (vitesse de dissolution, densité, perméabilité au composé actif).

L'étude d'une formulation se fait sous plusieurs aspects. D'abord sont évaluées les caractéristiques physiques et chimiques du comprimé sec. Puis, le transit dans le tractus gastro-intestinal est simulé par différentes méthodes pour étudier le comportement du comprimé et la libération de l'agent actif (la pharmacocinétique). Il est intéressant ensuite de corréler les résultats *in vitro* avec des résultats *in vivo*. Les prochaines sections discuteront ces différentes modalités de caractérisation et de suivi plus en détails.

3.4.1 Caractérisation *in vitro*

3.4.1.1 Caractérisation physique des comprimés monolithiques

Parmi la panoplie de techniques existantes, certaines sont davantage d'intérêt. La dureté se fait sur le comprimé à sec et permet une évaluation primaire de la cohésion des excipients et de l'efficacité de la compression. Les modifications physico-chimiques (interactions, humidité, compression) peuvent être suivies par FTIR et RMN. Les études d'optimisation vont s'attarder à la friabilité, prise sur un grand nombre de comprimés qui se percutent dans un dispositif rotatif (voir USP <1216>). La DRX donnera des informations sur la cristallinité. La morphologie interne ou de surface peuvent être vu par microscopie électronique à balayage.

3.4.1.2 Caractérisation du comportement dans des fluides simulés

Ces fluides miment le transit dans l'estomac et les intestins. Ils permettent d'analyser les temps de désintégration, le gonflement, la masse et l'érosion du comprimé ainsi que la libération de l'agent actif. La Pharmacopée américaine recommande comme fluide gastrique simulé (FGS) une solution aqueuse contenant le NaCl, le HCl et la pepsine (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2010). Le NaCl et le HCl

servent à mimer l'acidité et l'osmolalité du fluide gastrique tandis que la pepsine est une protéase gastrique responsable de la dégradation de 15% des protéines alimentaires (Rocha *et al.*, 2016). Pour fabriquer le FGS, la pepsine de muqueuses porcines est utilisée.

Le fluide intestinal simulé (FIS) est constitué de phosphate de potassium monobasique avec NaOH et des enzymes pancréatiques (pancréatine). La pancréatine est extraite des pancréas porcins et contient l'α-amylase, des lipases et des protéases pour aider la digestion des polysaccharides, des gras et des protéines.

Chez l'humain et les animaux, les propriétés du fluide gastrique peuvent varier avant et après un repas. L'ajustement des fluides simulés permet de mimer l'état d'un patient (nourri ou à jeun). Ces ajustements existent aussi pour les fluides canins simulés (Arndt *et al.*, 2013).

3.4.1.3 Dissolution dans des béchers de 900 mL thermostatés

Ce type de test est standardisé et bien répertorié (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2010). Les bains diffèrent dans la façon dont le comprimé est agité. Les bains à dissolution (voir USP <711>) utilisent des hélices ou des paniers dans des récipients thermostatés de 900 mL. Les contacts entre le comprimé et l'hélice ne sont pas trop fréquents ni trop intenses.

3.4.1.4 Désintégration dans des béchers de 900 mL thermostatés

Dans le bain à désintégration (voir USP <701>), le comprimé est mis dans un tube et couvert d'un disque flottant (polymère). Le dispositif est plongé à répétition dans un récipient de 900 mL de fluides simulés thermostatés. À la submersion, le tube est inondé de fluide, le disque flottant reste en surface et le comprimé est agité sous le flux

de liquide. À l'immersion du tube, l'eau s'écoule et le bouchon entraîne le comprimé vers le fond. Le but de cette méthode est de créer un contact mécanique pour simuler le péristaltisme et permet d'observer l'impact de l'environnement qui entoure le comprimé pendant le transit.

3.4.2 Corrélation avec des modèles animaux

Suite aux tests *in vitro*, les formulations doivent être corrélées avec des analyses *in vivo*. Les caractéristiques du système digestif vont varier d'un individu à un autre, et aussi entre les espèces comme chez les chiens.

Les modèles animaux peuvent varier selon plusieurs caractéristiques : proportions des segments du TGI, composition des fluides (pH, enzymes, force ionique, sels), différences de structures de l'intestin (présence de replis de la muqueuse, flore microbienne, épaisseur des muqueuses, structure des villosités) et volume des fluides du TGI. Cela a un impact lors des essais de formulation sur des sujets animaux et influencera la biodisponibilité de l'ingrédient actif. Certains composés pourraient être sensibles, par exemple, au métabolisme bactérien d'une espèce plus qu'une autre. Par exemple, à la **figure 3.10**, le premier composé ne se dégrade pas en présence de flore colonique d'humain et se dégrade complètement dans le contenu intestinal de rat tandis que l'opposé est observé pour le composé 2 (Hatton *et al.*, 2015). C'est pourquoi il n'existe pas de modèle parfait et que les études doivent être abordées en relation avec les particularités du composé.

Si pour un même composé la biodisponibilité est connue chez l'humain et chez le modèle, elles peuvent être corrélées ensemble. En répertoriant une bonne quantité d'études, il est possible d'établir une charte de corrélation en fonction de l'ionicité du composé et du modèle animal.

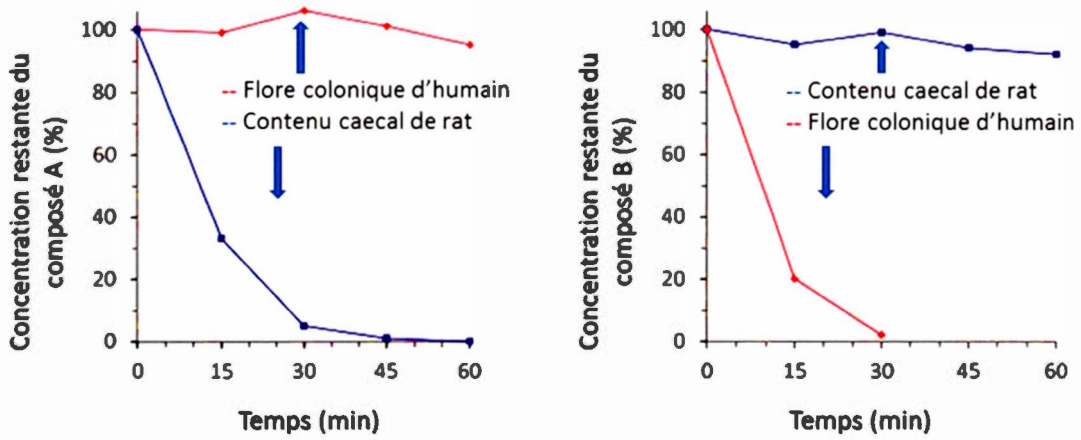


Figure 3.10 Comparaison de la dégradation de deux composés par la flore colonique humaine et dans du contenu caecal de rat. Recréer la flore bactérienne *in vitro* est difficile et les résultats *in vivo* peuvent être très différents. Dans cet exemple, le composé A est métabolisé rapidement par le microbiote du rat mais pas pour l'humain. L'inverse est aussi possible : la flore colonique humaine contient des bactéries qui métabolisent rapidement le composé B mais ce n'est pas le cas pour le contenu caecal du rat. Adaptation d'après (Hatton *et al.*, 2015).

Le caractère ionique de l'actif est aussi un facteur déterminant de la biodisponibilité. La corrélation entre l'humain et la souris (**tableau 3.4)** est bonne pour les composés acides mais presque nulle pour les composés basiques tandis que chez le chien, bonne pour les composés acides et acceptable pour les composés basiques (Hatton *et al.*, 2015).

Tableau 3.4 Corrélation de la biodisponibilité de différents composés entre des modèles animaux et l'humain. Adaptation d'après (Hatton *et al.*, 2015).

Type de composé	Coefficient de corrélation avec l'humain (R^2)			
	Souris	Rat	Chien	Primate
Acide	0,65	0,35	0,64	0,86
Basique	0,03	0,15	0,36	0,68
Neutre	0,51	0,38	0,37	0,57
Zwitterion	0,58	0,50	0,08	0,89
R^2	0,25	0,31	0,38	0,89

Pour cette raison, des modèles précis existent et sont adaptés au type de composé qui doit être suivi. Le porc est utilisé comme modèle d'intestin tandis que la souris est plus représentative pour le temps de vidange de l'estomac.

Il existe aussi des adaptations des fluides simulés selon la présence ou l'absence de nourriture. Pour le modèle canin, des phospholipides sont aussi ajoutés ainsi que des sels biliaires et des acides gras (Arndt *et al.*, 2013).

3.4.3 Suivi *in vivo* des formulations orales par rayons X

L'administration orale est la plus répandue des techniques dû à sa commodité, versatilité et facilité. Le temps de relargage d'un composé administré dans une formulation orale est habituellement déterminé *in vitro* et ensuite par analyse sanguine ou parfois d'urine et permet de corréler la biodisponibilité avec les résultats obtenus *in vitro*. Le suivi d'une formulation par imagerie est un peu moins commun et comporte quelques variables : composition de la formulation, concentration en agent opacifiant, temps avant largage de l'ingrédient actif (ou désintégration), type d'ingrédient actif, format et type du comprimé (enrobage, couches), modèle utilisé (i.e. humain, chien), suivi du composé actif (analyse sanguine ou urine) ainsi que l'endroit ciblé dans le TGI.

Il existe différentes modalités de suivi des formulations. L'imagerie est d'autant plus pertinente dans le cas d'une formulation ciblée à action locale (*i.e.* livraison d'enzymes à l'intestin) car les composés actifs ne s'absorbent pas dans le sang.

Le SB est surtout utilisé en suspension. Dans les études de pharmacocinétiques, il est utilisé sous forme solide pour suivre l'intégrité des formulations. Cela permet de déterminer le temps de transit, voir l'intégrité des comprimés et évaluer la performance des enrobages entériques (Kshirsagar *et al.*, 2011). Cette méthode consiste à intégrer le

SB dans le noyau d'un comprimé enrobé et de suivre par RX l'apparence de la formulation. Habituellement, le SB remplacera l'ingrédient actif dans un placebo.

En incluant le SB dans un comprimé à la place de l'ingrédient actif (puis enrobé en solution avec Eudragit FS 30 D), les RX ont permis de voir que pendant leurs essais, un patient sur 4 a eu le comprimé collé dans l'estomac pour plusieurs heures (Kshirsagar *et al.*, 2011). Cette conclusion aurait été impossible sans l'imagerie. Il y a aussi des articles similaires pour les enrobages par compression directe (Momin et Pundarikakshudu, 2005). Cela montre la pertinence de suivre par RX l'apparence d'une formulation pendant le transit. Cette technique s'applique aussi bien aux animaux comme les lapins (Senthil *et al.*, 2010).

3.4.4 Courte analyse thématique de la littérature

Dans le but de comparer les travaux déjà effectués et d'offrir un outil de référence en matière d'imagerie pour l'administration de formulations orales, les points clés de chaque article accessible de la littérature sont rapportés. La recherche fut effectuée en avril 2017 avec l'outil de recherche *Science Direct*. Les requêtes de recherche étaient du type 'imagerie formulation scintigraphie' ou en utilisant un nom de technique *i.e.* 'imagerie formulation orale rayons X'. Les résultats ont été triés par date en sélectionnant les articles comportant des radiographies pour les répertorier en annexe (**tableau A.1**. Une revue de la littérature a été effectuée aussi pour la scintigraphie en annexe (**tableau A.2**). Les résultats sont compilés dans le graphique de la **figure 3.11**.

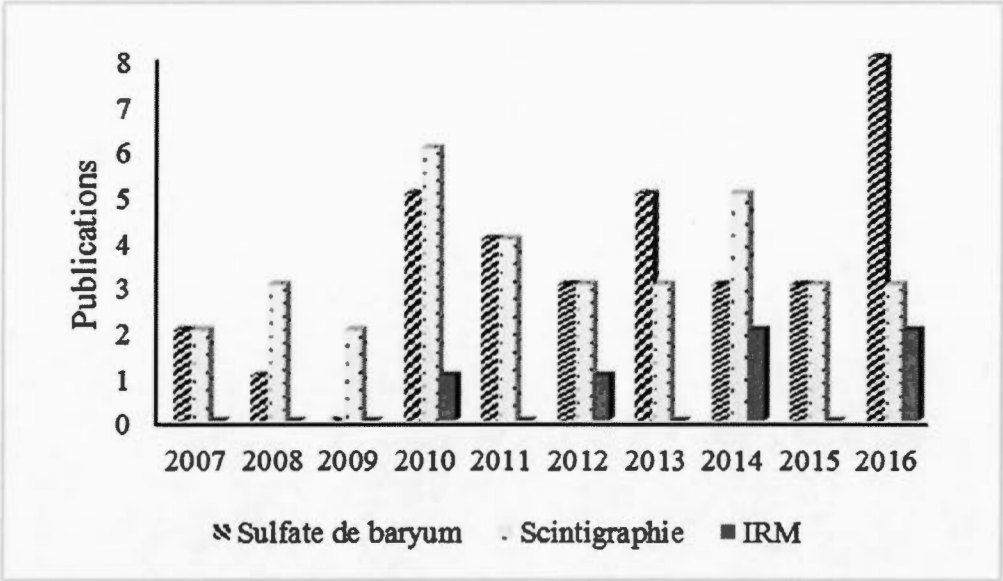


Figure 3.11 Analyse thématique non-exhaustive des publications accessibles sur le suivi *in vivo* de formulations orales. Conçu à partir de Science Direct.

La scintigraphie semble graduellement délaissée, au profit des RX et de l'IRM. La scintigraphie est surtout utilisée sur l'humain tandis que les rayons X sont davantage utilisés sur des animaux. Les deux techniques servent en général à étudier l'efficacité des enrobages des formulations. Les concentrations en sulfate de baryum sont variables. Parmis toutes les références dans les deux tableaux, l'impact du SB fut peu étudié. Aussi, il y a un nombre limité d'études sur les matrices monolithiques, surtout ciblant le côlon.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

4.1 Concepts et objectifs

Les formulations ciblées permettent de concentrer l'agent actif dans une section particulière du corps. Habituellement, la cinétique d'absorption du médicament est déterminée par des analyses biochimiques (sang, urine). Dans le cas d'agents actifs destinés à agir localement dans l'intestin (*i.e.* des enzymes), la cinétique ne peut être obtenue par ces méthodes. Si l'agent actif ne diffuse pas en dehors du comprimé avant la désintégration, il peut être possible d'associer le moment de désintégration du comprimé au moment de libération du contenu actif. Dans ce cas, la désintégration du comprimé pourrait être suivie par des techniques d'imagerie non-invasives.

Ce n'est que récement que l'utilisation du sulfate de baryum comme traceur pour les formulations orales est devenue répendue. Lorsque le SB est incorporé dans les comprimés, il devient possible de les suivre par rayons X. Pour cela, le composé actif du comprimé est souvent substitué avec le SB. Le SB n'interagit pas dans le tractus gastro-intestinal (TGI) dû à son insolubilité et il est donc éventuellement éliminé avec les selles.

Ces propriétés particulières pourraient influencer le comportement des comprimés lors du transit dans le TGI. De plus, la concentration en SB pourrait influencer l'opacité du comprimé aux rayons X et donc sa visibilité. Afin d'étudier l'impact du SB sur des comprimés, différents excipients ont été comparés.

Différents types de polymères (neutres, anioniques et cationiques) pouvant former des matrices ont été compressés avec le SB. Le carboxyméthylamidon (CMA, anionique) étant un excipient relativement nouveau, il semblait pertinent de vérifier la corrélation des résultats *in vitro* avec des résultats *in vivo*. Le CMA sera comparé avec un autre polymère anionique de source commerciale, la carboxyméthylcellulose (CMC), avec le chitosane (CHI, cationique) et avec l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC, neutre).

L'effet de la concentration de SB sur la dureté des comprimés fut analysée. Les modifications chimiques des excipients après compression en présence de SB furent observées par spectroscopie. La microscopie permettra d'observer les comprimés après le passage dans les fluides simulés (voir à la **figure 4.2**).

Une publication récente proposait qu'il pourrait être possible de diminuer l'inflammation intestinale en administrant des enzymes, sous forme de comprimés oraux ciblant l'intestin et surtout le côlon (Calinescu *et al.*, 2012). Comme les enzymes ont des masses moléculaires de l'ordre du kiloDalton, une protéine plus commune pourrait être utilisée comme modèle, l'albumine de sérum bovin (ASB). L'influence de la présence de protéine sur les caractérisiques du comprimé sera aussi analysée.

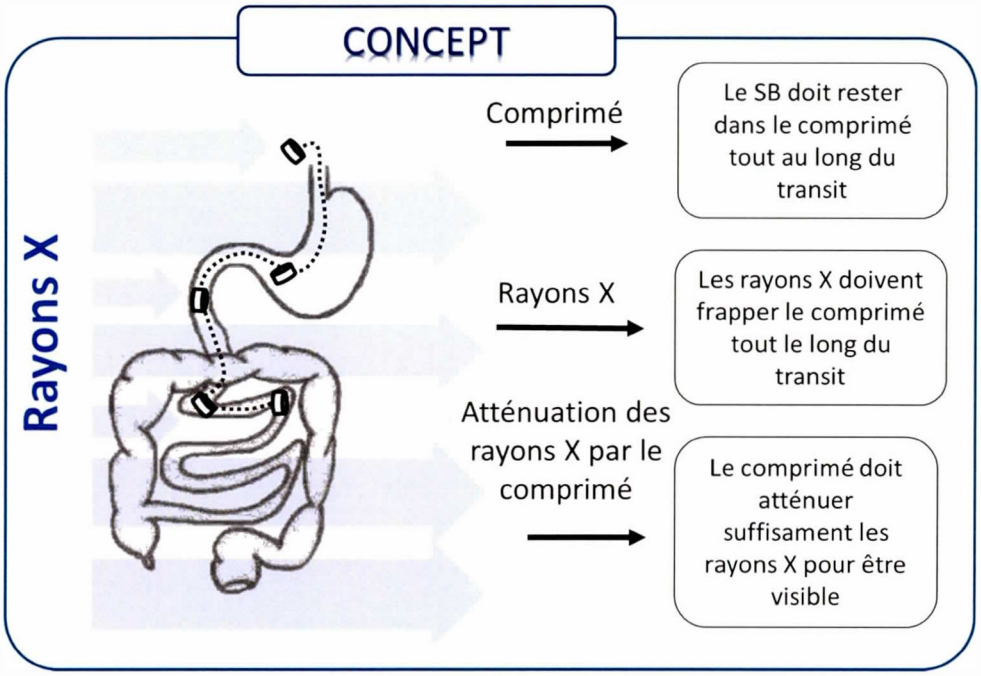


Figure 4.1 Concept du suivi d'un comprimé par rayons X

Le projet est innovateur dans le sens où peu de publications rapportent l'étude des comprimés monolithiques incorporant le sulfate de baryum et ciblant les intestins (voir la section 2.5.1). De plus, le CMA est peu étudié *in vivo*.

Objectifs

- Étudier l'impact du type de polymère formant la matrice (anionique, neutre, cationique) et de la concentration en SB.
- Évaluer l'interaction du SB avec les polymères dans les comprimés par microscopie électronique à balayage, spectroscopie infrarouge et dureté.
- Observer le comportement des comprimés et leur temps de désintégration par immersion dans des fluides gastriques et intestinaux simulés.
- Administrer *in vivo* des formulations ciblant une partie de l'intestin et corréler les temps de désintégration dans le modèle animal avec les temps de désintégration *in vitro*.

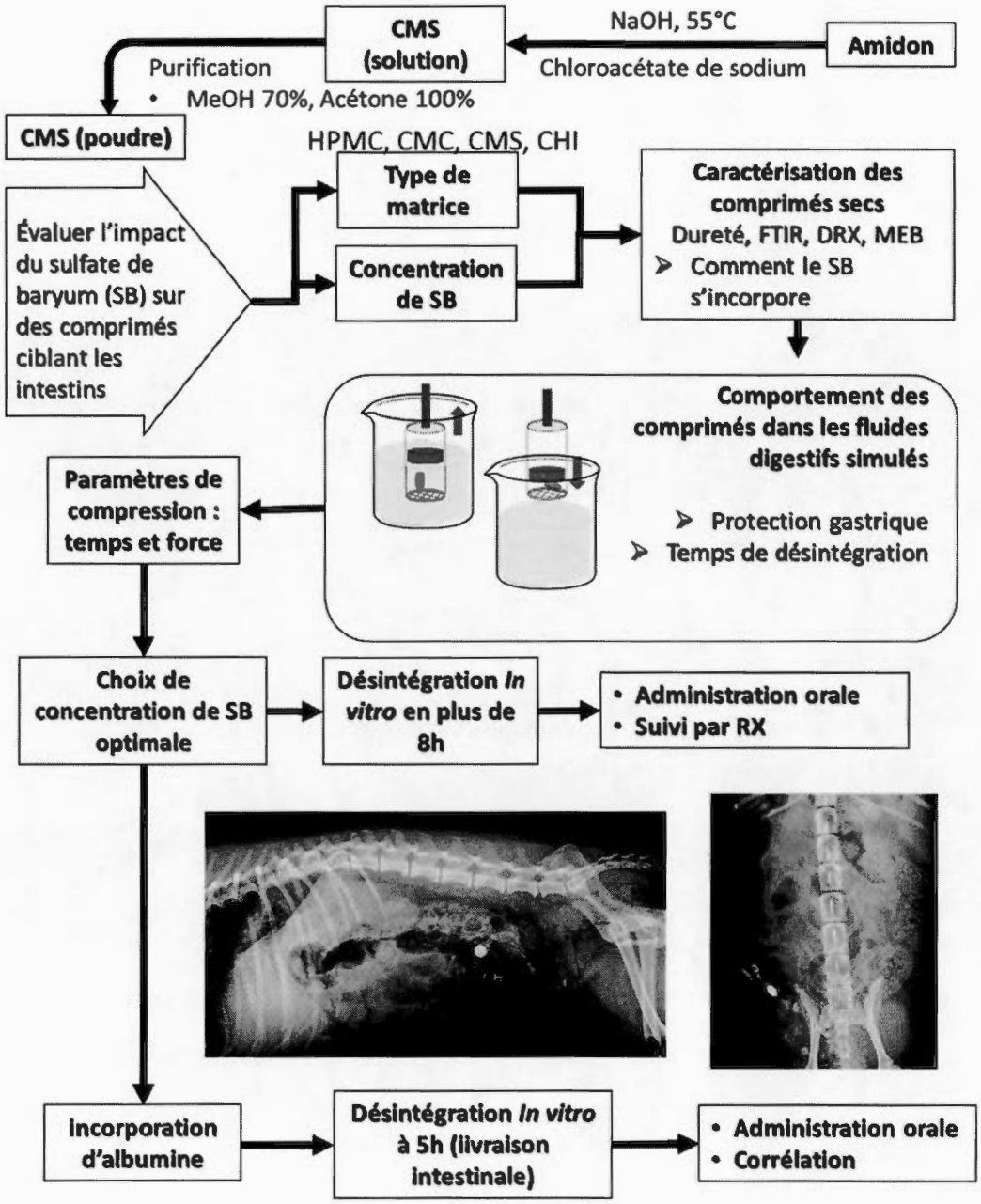


Figure 4.2 Présentation schématique des différentes étapes du projet de maîtrise.

Hypothèses

- Il serait possible de suivre *in vivo* des comprimés dans le trajet gastro-intestinal (TGI) en utilisant le sulfate de baryum (SB) comme agent opacifiant.
- Le SB est suffisamment inerte pour rester dans le comprimé
- Des polymères sélectionnés permettraient de former des matrices pouvant incorporer les SB et avoir une libération ciblée aux intestins
- Un modèle de chien beagle pourrait offrir une bonne corrélation *in vitro-in vivo* pour l'étude des formulations orales ciblées

4.2 Méthodes de travail

Synthèse du carboxyméthylamidon - Le CMA a été préparé au laboratoire selon une méthode publiée (Calinescu *et al.*, 2005). L'amidon à haute teneur en amylose est gélatinisé à 55°C dans une solution basique. La carboxyméthylation a été effectuée en ajoutant le chloroacétate de sodium. Le mélange a été neutralisé avec l'acide acétique, lavé avec du méthanol 70% et séché à l'acétone.

Formulation - La première étape (**figure 4.2**) fut de caractériser et d'étudier *in vitro* l'impact de l'incorporation du SB comme radio-opacifiant dans des formulations ciblant les intestins. Différents excipients ont été sélectionnés : de la hydroxypropyl-méthylcellulose (HPMC, neutre) de différentes viscosités, de la carboxyméthylcellulose (CMC, anionique) et du carboxyméthylamidon (CMA, anionique). Les comprimés sont formés par compression directe des mélanges de poudre dans une presse manuelle. L'impact du SB fut évalué en variant le type de matrice (ionique, non-ionique) ainsi que la concentration en SB (de 0 à 80% pour HPMC et 0 à 60% pour les autres). L'albumine fut utilisé comme protéine modèle pour simuler une charge en agent biologique actif.

Caractérisation des comprimés - Ils furent initialement caractérisés à sec par spectroscopie infrarouge pour voir les interactions chimiques, par diffraction des rayons X pour analyser leur cristallinité, par microscopie électronique à balayage pour évaluer la morphologie et par leur dureté. Ensuite leurs temps de désintégration dans les fluides digestifs simulés ont été évalués dans un bain désintégrant (USP <701>) : 2h dans le fluide gastrique simulé (FGS) avec pepsine et au moins 8h dans le fluide intestinal simulé (FIS) avec pancréatine.

Analyse de l'opacité des comprimés - Afin d'établir une concentration théorique optimale de SB, des comprimés contenant différentes concentrations de SB ont été observés par rayons X. À l'aide d'un logiciel analyseur d'image, l'opacité a été calculée et portée en graphique. Des comprimés de différentes formes et épaisseur ont été comparés. Le pouvoir opacifiant du chlorure de calcium a aussi été comparé au SB.

Choix des formulations administrées à un modèle animal - L'étude de leur comportement dans des fluides digestifs simulés a permis de sélectionner des formulations avec des temps de livraison déterminés correspondant à différents segments du TGI. Pour évaluer le fonctionnement de la méthode, un comprimé non désintégrant fut d'abord formulé et administré. Celui-ci ne contient que la HPMC et le SB et résiste plus de 8h à la désintégration *in vitro*.

Ensuite, un comprimé ciblant les intestins a été mis au point, contenant le CMA, la HPMC, le SB et l'ASB. Le temps de désintégration a été ajusté en variant le ratio et le type de HPMC puis il a été administré en duplicata. Afin de comparer l'excipient fait au laboratoire avec un excipient commercial, une même formulation mais dont le CMA est remplacé par la CMC est aussi administrée en duplicata.

Les résultats *in vitro* de simulation du TGI ont été comparés avec ceux de mêmes formulations administrés à un modèle animal. Cette étude permettra ainsi d'établir un protocole de formulation et de suivi pour les prochaines analyses *in vivo*.

PARTIE II – SECTION EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

LE SULFATE DE BARYUM COMME TRACEUR POUR LE SUIVI *IN VIVO* DES COMPRIMÉS MONOLITHIQUES AVEC UN AGENT BIOACTIF

Marc-André Labelle[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Isabelle Masseau[2], Younes Chorfi[2] et Mircea Alexandru Mateescu[1] *

[1] Département de Chimie and Centre, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada

[2] Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada

---

* Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs

Marc-André Labelle – Expérimentation *in vitro*, rédaction, figures, recherches bibliographiques
Pompilia Ispas-Szabo – Rédaction, supervision du projet
Isabelle Masseau – Investigation *in vivo*, analyse des radiographies
Younes Chorfi – Supervision du projet (partie modèle animal, aspect éthique)
Mircea Alexandru Mateescu – Supervision du projet et révision du manuscrit

Résumé

Afin de suivre la libération de macromolécules (*i.e.* protéines, enzymes thérapeutiques) dans l'intestin, le sulfate de baryum (SB) a été utilisé comme traceur pour des comprimés monolithiques obtenues par compression directe. L'impact du SB sur différentes matrices (neutres, ioniques) a été étudié. Certains excipients anioniques comme la carboxyméthylcellulose (CMC) et le carboxyméthylamidon (CMA) protégent le contenu biologique lors du transit gastrique, permettant le transport d'un agent biologiquement actif vers l'intestin. La caractérisation à l'état sec a été faite par microscopie électronique à balayage (MEB), diffraction de rayons X (DRX) et spectroscopie IR. Les comportements des formulations contenant le SB (0-80%) ont été étudiés dans les fluides gastro-intestinaux simulés. Les formulations sélectionnées ont été suivies *in vivo* dans un modèle animal et les temps de désintégration (TD) comparés avec ceux obtenus *in vitro*. Les TD des formulations à base de polymères neutres, avec et sans SB, étaient de plus de 8h, tandis que pour les matrices ioniques, les TD étaient de 2 à 5h. La DRX et la spectroscopie IR ont montré une interaction possible entre le SB et le chitosane (cationique) mais pas avec les excipients anioniques (CMC, CMA). La MEB prise avant et après le passage des comprimés dans les fluides gastro-intestinaux simulés montre que le SB reste dans les pores des matrices, permettant le suivi *in vivo*. L'incorporation de 30% de protéine (et 40% SB) n'a pas influencé beaucoup les comportements des comprimés. En conclusion, le SB a permis de bien visualiser les comprimés pendant le transit gastro-intestinal et influence peu les propriétés des matrices neutres et anioniques. Basé sur ces résultats, le SB et l'imagerie par rayons X représentent une bonne alternative à la scintigraphie pour le développement des médicaments.

Mots-clés : carboxyméthylamidon, sulfate de baryum, imagerie rayons-X, protection gastrique, comprimés monolithiques, carboxyméthylcelllose

STUDY OF BARIUM SULFATE TRACER TO FOLLOW *IN VIVO* FORMULATIONS CARRYING BIOACTIVE AGENTS

Marc-André Labelle[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Isabelle Masseau[2], Younes Chorfi[2] and Mircea Alexandru Mateescu[1] *

[1] Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada

[2] Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe (Quebec), Canada

*Corresponding author
Phone : 1 (514) 987 4319
Fax : 1 (514) 987 4054
e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

ABSTRACT

In the aim of following the release of macromolecules (i.e. proteins, therapeutic enzymes) in the intestine, the barium sulfate (BS) was used as tracer for monolithic. The impact of BS on various matrices (neutral, ionic) was studied. Excipients such as anionic carboxymethylcellulose (CMC) and carboxymethylstarch (CMS) protect the biological content from the gastric acidity, allowing also a targeted transport of the active. The characterization of dry tablets was done by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and IR spectroscopy. The behavior of the tablets containing BS (0-60%) was studied in the simulated gastro-intestinal fluids. The selected formulations were followed in an animal model and the *in vivo – in vitro* disintegration times (DT) were compared. The DTs of the tablets based on neutral polymer, with and without BS, were longer than 8h, whereas those for ionic matrices were of 2-5h. The SEM, taken before and after transit in simulated fluids, show that the BS remains in the pore, allowing a good follow-up. The incorporation of 30% protein (with 40% BS) has not a major impact on the tablet behavior. In conclusion, BS and X-ray imagery represent a good alternative to scintigraphy for development of high molecular weight bioactive agents.

Keywords: Barium sulfate, monolithic tablets, carboxymethylstarch, X-ray imagery, *in vitro – in vivo* correlation, beagle model

5.1 Introduction

Many pharmaceutical studies are focused on bioavailability of active principle ingredient (API) by correlating *in vitro* release of an active compound with its pharmacokinetic (**PK**) and pharmacodynamic (**PD**) profiles. Imaging techniques may provide valuable additional data related to drug delivery site and formulation behavior. In the particular case of orally administered bioactive agents targeted to the colon and required to act locally (*i.e.* for Ulcerative Colitis) with no impact with other parts of the intestinal tract, formulation is very challenging. If the active agent is not absorbed, its efficiency cannot be followed by PK/PD studies. Furthermore, the drug can be degraded by stomach acidity and the whole formulation may be affected by the intestinal content and peristaltism. Imaging techniques could then be great tools to monitor the delivery site of bioactive agents and the integrity of the dosage form. These would be important aspects allowing a good *in vivo-in vitro* data correlation.

The most commonly used imaging techniques for monitoring the transit of tablets in the GIT consist of radiography, scintigraphy and magnetic resonance imaging (**MRI**). The MRI is safe although it requires general anesthesia in animal models. It is also expensive and necessitates a long acquisition time. It allows to easily observe floating formulations in the stomach but visualisation in the lower intestinal tract is difficult du to the superposition of the bowels (Tadros et Fahmy, 2014). Scintigraphy is widely used to follow oral dosage forms (Celkan *et al.*, 2016; Pislar *et al.*, 2015; Sharma, B. G. *et al.*, 2016; Varum *et al.*, 2013) and uses radioisotopes such as technetium or samarium. However, it has several disadvantages as exposure when manipulating the animals, potential risks of radiation contamination of facilities by animal wastes and leaks/spillage (Barbosa *et al.*, 2015), the need of safe handling of isotopes in nuclear unit, poor resolution, low-contrast and high noise level (Lyra et Ploussi, 2011).

Numerous studies demonstrated that the X-rays could be less expensive than other imaging techniques (Pogue, 2015; Saini *et al.*, 2000; Sistrom et McKay, 2005) because the only requirement is a regular source and detector, which is greatly cost effective. Moreover, X-ray plain radiographs are more accessible than the computed tomography (**CT**) scan, which is made of numerous X-ray scans and involves a higher exposure of the body. Barium Sulfate (**BS**) is a commonly used contrast medium for evaluation of the transit in the gastrointestinal tract (**GIT**) in animals and humans (Root et Morgan, 1969). X-ray techniques with BS are relevant to disease diagnostic and medical follow-up, not only for humans but also for various species including dogs (Jeon, S. *et al.*, 2014; Spinella *et al.*, 2014). The excellent mucosal adhesion provided by the sulfate groups combined with suited physical properties (high atomic number and ideal energy interaction in the diagnostic range of X-rays) make BS highly suitable for non-invasive radiographic imaging of the intestinal tract and it has been used for this purpose for several decades (Ambrosini *et al.*, 2007; Dambha *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2006; O'Connor et Summers, 2007; Rex *et al.*, 1997; Rockey *et al.*, 2005; Rollandi *et al.*, 2007; Rosman et Korsten, 2007). In addition, it does not require chemical restraint (*i.e.* sedation) in most cases if animal is acclimated. For these reasons, X-ray radiographic technique may represent an ideal alternative to follow an oral dosage form of medication by incorporating a radiographic opacifying agent.

Additional interesting features of BS are its high density and its insolubility in the GIT, which allow orally administered tablets to be followed *in vivo*. BS concentrations in the formulation can greatly vary depending on the purpose of the study and properties to be evaluated *i.e.* efficiency of coating, tablet integrity, floating time. For *in vivo* follow-up of formulations targeted to the intestinal tract, wet coating studies used placebo tablets incorporating BS in lieu of a drug in the core (Kshirsagar *et al.*, 2011). There are few reports on the evaluation of dry coating using BS as tracer for intestinal delivery (Momin et Pundarikakshudu, 2005; Pachuau et Mazumder, 2013; Tung *et al.*, 2016) and of coating-free monolithic alginate or guar gum-based tablets

incorporating BS for intestinal delivery of mesalazine (Tugcu-Demiroz *et al.*, 2004, 2007). Several studies substituted the active pharmaceutical ingredient (**API**) with BS and the *in vivo* models were mostly human and rabbit (Baumgartner *et al.*, 2000; Dev *et al.*, 2011; Hamori *et al.*, 2016; K. Purushotham Rao, 2003; Kshirsagar *et al.*, 2011; Mansuri *et al.*, 2016; McConnell *et al.*, 2008; Momin et Pundarikakshudu, 2005; Pachuau et Mazumder, 2013; Patel, M. M. et Amin, A. F., 2011; Saphier *et al.*, 2010; Senthil *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2012; Tugcu-Demiroz *et al.*, 2004, 2007). Fewer reports are available for oral dosage forms follow-up in canine model using X-rays and BS (ElMeshad et El-Ashmoony, 2012; Tung *et al.*, 2016; Yassin *et al.*, 2010). The challenge of using BS in solid dosage forms consists of finding a good balance between its loading that should not be too high to negatively affect tablet properties but sufficient to offer a good *in vivo* contrast, allowing tablet traceability by X-rays.

Without the use of an enteric coating, it is possible to design matrix formulations with suitable properties for a specific drug or delivery site. For instance, anionic matrices could afford gastric protection by forming an outer gel layer whereas neutral matrices as hydroxypropylmethylcellulose (**HPMC**) could provide a good carrying capacity and less interaction with other excipients or active components.

Recent works showed the possibility of derivatized biopolymers such as carboxymethylstarch (**CMS**) matrix to carry and protect biological agents such as peptides (Calinescu *et al.*, 2007), enzymes (Calinescu *et al.*, 2012; Massicotte *et al.*, 2008) or probiotics (Calinescu et Mateescu, 2008) when administrated orally as monolithic solid dosage forms. The monolithic tablets with CMS or CMS and chitosan (**CHI**) obtained by direct compression showed gastric protection and targeted drug release. The CMS may modulate the dissolution rate by its degree of substitution (**DS**) (Calinescu et Mateescu, 2008; Lemieux *et al.*, 2009) and its susceptibility to intestinal pH and α-amylase enzyme. The **CHI**, a cationic polymer soluble in acidic media, forms a protective gel layer that can only be degraded in the colon, allowing a targeted release of the drug (Calinescu et Mateescu, 2008).

While *in vitro* dissolution studies are reproducible, mimicking living biota and body peristaltic motion is more difficult. Inter and intra-species differences are observed because of physiological and biochemical variability in their GIT features. Despite these differences, a good similarity is observed in the ratio between the lengths of different segments of the intestine in case of pig, dog and human, as shown in **figure 5.1**. For this reason, the intestinal transit for *in vivo* model *i.e.* dog may correlate well with human transit; they have similar diet, organ volumes and residence times for dosage forms (Dressman, 1986; Hatton *et al.*, 2015; Kararli, 1995).

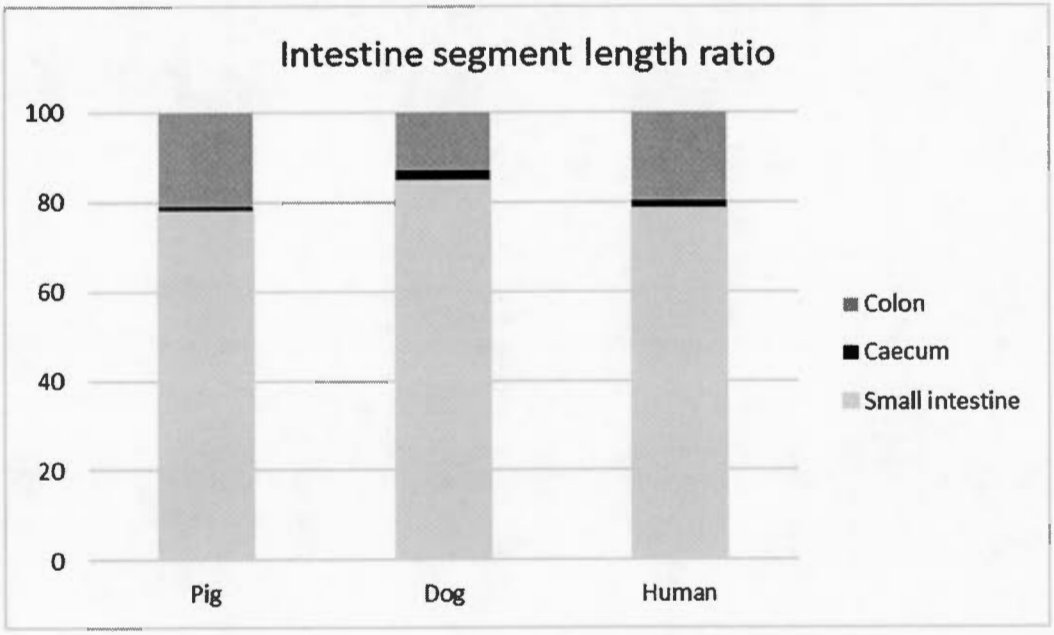


Figure 5.1 Comparison of intestine segments length ratio for pig, dog and human. Adaptation from (Kararli, 1995).

The aim of the present study was to investigate the impact of BS content on formulations of bioactive agents targeted to the colon and to correlate *in vitro-in vivo* data using X-ray imaging. Furthermore, we also evaluated the impact of replacement of an excipient by BS on the disintegration times of tablets *in vitro*. This will serve as

a model for future estimation of disintegration times of formulations with and without BS.

5.2 Materials and methods

Reagents – Barium sulfate (BS), with a particle size of 1 μm, was a gift from Cimbar (Georgia, USA) and used as received. The various grades (K4M, E4M, K100 and K100M) of HPMC were gifted by Colorcon (Pennsylvania, USA). Commercial chitosan (CHI) of medium molecular weight (190 kDa to 310 kDa) from Sigma was sieved to obtain particle size (φ) between 75-300 μm. Pepsin from porcine mucosa (460 units/mg solid) and pancreatin from porcine pancreas (4x USP specifications) were obtained from Sigma. Carboxymethylcellulose (CMC) and other chemicals were all reagent grade and used as received.

Carboxymethylstarch (CMS) of low degree of substitution (DS) was prepared in the laboratory following a previously published method (Mulhbacher *et al.*, 2001). Briefly, 140 g of high amylose starch (Hylon VII, gifted from Ingredion, USA) was dissolved in 340 mL water at 55 °C and gelatinized with 470 mL 1.5 M aqueous sodium hydroxide. The substitution occurred by reacting with sodium monochloroacetate for 1h. After adjustment to pH 7, the slurry was washed with aqueous 60 % methanol and filtrated until the conductivity reached approximately 50 μS. Water was removed with acetone and the powder was kept under hood until dried. The DS, determined by back titration, was of 0.03 (1 carboxymethyl group for 30 glucose units).

Tablet preparation - Tablets were made by direct compaction with a Carver hydraulic press (Wabash, IN, USA). Powders of all ingredients, tracer and protein model were mixed for each formulation into a ceramic mortar in a quantity equivalent to about 15 tablets. All tablets were compressed 10 s at 2 tons in a cylinder mold with a diameter of 9.54 mm.

IN VITRO TESTS

Tablets physical testing in dry phase

Tablet hardness - Data were collected as per the United States Pharmacopeia (USP) <1217> with a Vankel hardness tester (Benchsaver™ Series, VK 200). The crushing strength, σ_x (kP/mm^2) is given by **Eq.1**, where F is the crushing strength (kilopounds, kP), D is the diameter (mm) and H is the height (thickness, in mm) of the tablet. For each formulation the thickness was adapted to 3.00 mm ± 0.05 mm by adjusting the weight, except for CMS tablets (1.00 mm ± 0.05 mm) having a hardness that exceed the maximal limit of the hardness tester. Variation in height was corrected by Eq.1 that reports hardness to the height of the tablet (for cylindrical tablets). All tests were done in triplicate.

$$\sigma_x = \frac{2F}{\pi DH} \qquad \textbf{Eq. 1}$$

X-ray diffraction (XRD) analysis of the crystallinity of dry tablets of CMS or CHI containing BS was done on a D5000 Bruker diffractometer (Bruker AXS, Madison, WI, USA). If a sample has enough crystallinity, X-rays are diffracted in specific patterns in the crystalline network, displaying sharp peaks at specific diffraction angles.

Infrared spectroscopy (ATR/RAMAN) was performed on Nicolet 6700 FTIR coupled with NXR 967 FT RAMAN (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) with Omnic data treatment. Transmission spectra were obtained using a Bomem spectrometer with Grams/32 software. DRIFT: (Avatar Smart diffuse reflectance accessory, SDRA) for Nicolet FTIR 4700. Chemical interactions or structural modifications were evaluated from IR band changes.

Scanning electron microscopy (SEM) was carried in a Hitachi microscope (High Technologies America, Pleasanton, CA, USA). Tablets were hydrated 2h in simulated

gastric fluid (**SGF**) and 2h in simulated intestinal fluid (**SIF**). They were then frozen 24h and lyophilized 72h. Prior to analysis, tablets were lightly coated with platinum by electrodeposition.

Characterization of the tablets in simulated gastric and intestinal fluids

The simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) to simulate human GIT fluids are recommended and detailed in the US Pharmacopeia (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2010). The proposed time to simulate gastric transit is 2h in SGF followed by SIF up to 10 h. The SGF was made with 7 mL HCl, 2 g NaCl and 3.2 g pepsin enzyme for 1 L. The SIF was prepared with 6.8 g monobasic phosphate in 750 mL distilled water, 77 mL 0.2 N NaOH and 10 g pancreatic enzymes, adjusted to pH 6.8 with 0.2N NaOH.

Swelling studies - Tablets were immersed in 50 mL capped tubes filled with 40 mL of simulated fluids and then placed on a rotary agitator at 40 rpm (1 inversion per 2 seconds) for at least 8h or until total disintegration. Hydrated tablets were weighted at specific time points in triplicate.

Disintegration characteristics were established in an Electrolab disintegration tester (Betatek Inc., ON, Canada) using two baskets with 6 tubes each and having a floating disk to make contact with the tablets. The beakers were kept in a bath at 37 °C and were filled with SGF or SIF. The shape of tablets was recorded every 15 minutes and the disintegration time (determined in triplicate) was considered when the formulation is completely dissolved or eroded.

Evaluation of gastric protection – Bromocresol green (a pH indicator) was added to the dry powders before compression. By its color change (yellow below pH 3.8 and blue above 5.4) the indicator allowed to follow the penetration of SGF into the analysed tablets and eventual pH modifications.

***In vivo* monitoring by X-rays**

A 3-year-old beagle dog (12 kg), fed once a day every evening, was used for this study. All the formulations were administered in the morning on empty stomach. This protocol was kept for the entire study in order to reduce artefacts. The time points of radiographic acquisitions varied according to the transit time for each formulation.

Preliminary radiographs of the dry tablets containing various amount of BS were taken before tablet administration. Opacity of the tablets was evaluated on the obtained radiographs using Digimizer, an imaging software allowing calculation of average values from various areas so that the result is representative of the entire surface of each tablet. Background was also considered. For opacity and *in vivo* studies, the X-ray equipment used was a Siemens Axiom Iconos (Oakville, ON, Canada) with 75 kV, automatic exposure control (AEC); Computed radiographs were acquired using a phosphor-storage system (Agfa CR-DX system, Toronto, ON, Canada), transferred to a picture archiving communication system (Agfa, Toronto, ON, Canada) and reviewed using Impax 6.0 (Agfa, Toronto, ON, Canada).

5.3 Results

The passage of a tablet through the gastro-intestinal tract (GIT) is a complex process that involves mechanical forces and many interactions with epithelia and fluids. Preliminary investigations evaluated the hydration of the tablet, initially dry, that will become hydrated first on its surface and then through the core. From this perspective, *in vitro* characterization of tablets was done in both - dry and wet phases. Then the *in vitro* behaviour of tablets in simulated fluids was correlated with the *in vivo* radiographic results obtained in beagle model.

The formulations designed for this study were tested *in vitro* in SGF and SIF following the USP recommendations; tablet disintegration time or weight changes were

reported. The formulations with maximal mechanical stability at different BS loadings were selected for these experiments based on the contrast of the tablets. The final step consisted of *in vitro in vivo* comparison of formulations containing BS and bovine serum albumin (BSA) used as bioactive model. These formulations were based on anionic polymers CMS or CMC mixed with the neutral polymer HPMC.

5.3.1 Formulation approach

The formulations were developed keeping in mind the necessity to provide protection from gastric acidity, preventing damage to the bioactive agents. Furthermore, the incorporation of BS as an opacifying agent should not affect drastically the mechanical behavior of the tablet and the time of its disintegration. Three main categories of matrices (neutral, anionic and cationic) were prepared using carbohydrate polymers HPMC, CMC, CMS, CHI or combinations of two or more of these polymers. In a first set of experiments the objective was to evaluate the impact of BS on matrix behavior and the maximal loading of BS that could be carried by each type of matrix. **Table 5.1** summarizes formulations and tablet disintegration times with and without BS.

The HPMC and CMS+CHI could incorporate up to 70 % BS. However, CHI alone (Table 5.1, formulations 10-11) could not carry more than 20 % BS since tablet compaction failed at higher loading. For disintegration tests, two types of devices were used: i) a rotary mixer providing a mild mechanical stress and ii) a standard USP disintegration equipment. At higher mechanical stress (USP method), CMS was disintegrated faster (around 3h) than HPMC, which was not significantly affected by the stronger agitation conditions. Tablets based on CMS+CHI association obtained by direct compression (Table 1, formulations 4-5) may not be strong enough such as those obtained with coprocessed polyelectrolyte complexes (Assaad *et al.*, 2011), explaining

thus the faster disintegration. Consequently, the matrices based on HPMC, on CMC and on CMS were retained for further *in vivo* investigations.

Tableau 5.1 ***In vitro*** **disintegration times of matrices based on neutral, anionic and cationic polymeric excipients.** Both rotary agitator and USP disintegration experiments were carried out for 2h in SGF followed by SIF until tablets disintegration.

#	Polymeric matrix		BS loading (%)	Disintegration time (h)	
				Rotary agitator	USP method
1	Neutral	HPMC (K100M/E4M/E10M)	0	>8h	>8h
2			40	>8h	>8h
4		CMS+CHI	0	>8h	5h
5			40	>8h	-
7	Anionic	CMS	0	5h	2h
9			60	6h	3h
10	Cationic	CHI	0	3h	-
11			20	4h	-

5.3.2 Tablets characterization in dry phase

In a dry state, possible molecular interactions induced by the incorporation of BS in the polymeric matrices were analysed using various techniques.

Tablets density and hardness – Considering that the tablet mass was always adjusted in order to keep constant the tablet geometry (thickness at 3.00 mm), it was of interest to correlate the tablet mass with BS loading. For all neutral, anionic, and cationic tested polymers, tablet masses increased constantly with BS loading meaning that BS has the same effect on the densities of all matrices. Tablets hardness, calculated with Eq.1 and expressed as the tensile strength, is a parameter that may give insights on tablet cohesion. Its variation with BS loading is illustrated in **figure 5.2**, showing that tablets based on CMC and CHI had poor cohesion over 30% and 50% BS loading. For CMS, very high crushing strength values were obtained until 50% BS loading

which may be explained by the capacity of starch V form to preserve hydrogen association. These data fit well with the results of Lemieux et al (Lemieux *et al.*, 2009) and Le et Mateescu (Le Tien et Mateescu, 2017).

XRD characterization: The level of crystallinity in the tablets was mainly related to the BS content. **Figure 5.3** shows that BS alone or in presence of CHI and CMS exhibits similar peaks, which correspond to the BS profile. Comparable results were obtained for CMC polymeric compositions (data not shown).

Infrared analysis allowed to evaluate possible interactions between BS and excipients. In FTIR, the BS peaks were more intense and sharper than the peaks of polymers, making the spectra interpretation challenging. It was found that infrared RAMAN gave lesser peaks for BS and it was used to analyse the tablets with and without BS (**figure 5.4**). Those with CHI were reported considering the possibility of ionic interactions between its amine groups and sulfate of BS.

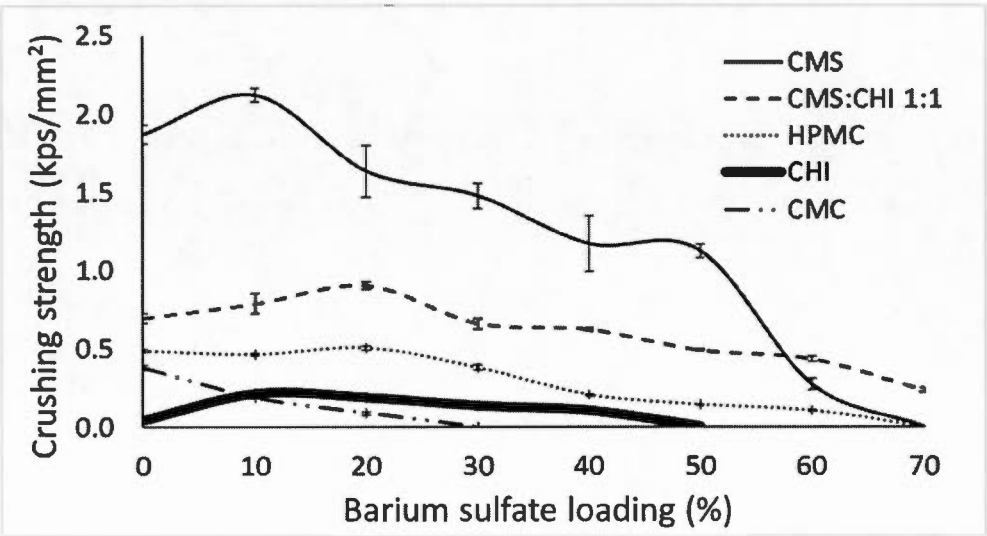


Figure 5.2 Tensile strength of various tablets with BS loadings, based on different polymers. Same compression force was used for all tablet.

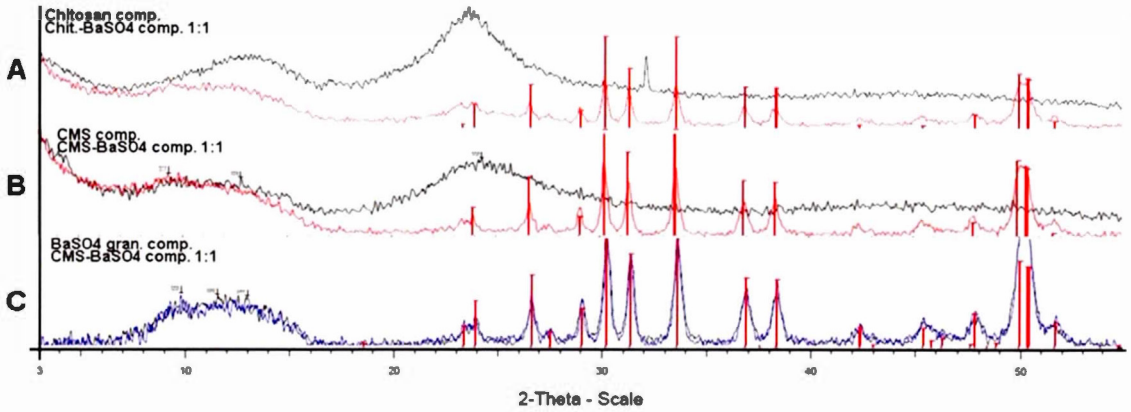


Figure 5.3 Diffractograms of CHI and CHI:BS 1:1 (A), CMS and CMS:BS 1:1 (B) and BS and CMS:BS 1:1 (C). The BS has a high crystallinity, as shown by the numerous diffracting peaks.

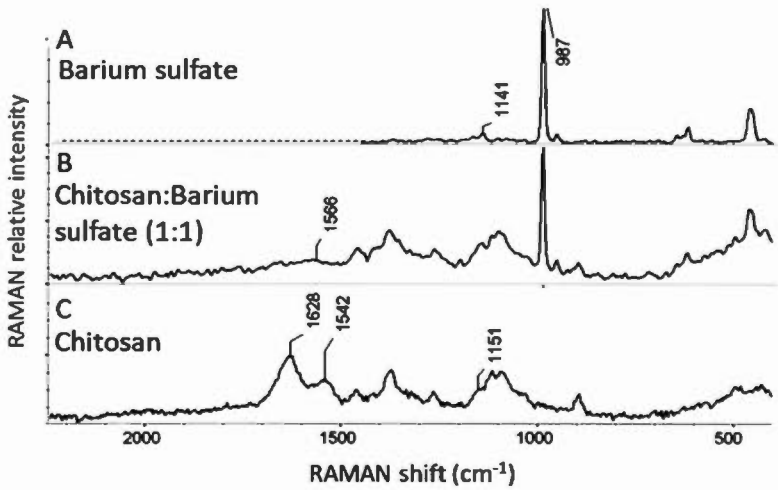


Figure 5.4 RAMAN infrared spectra of dry tablets based on BS alone (A) and on CHI:BS with (B) and without (C) barium sulfate.

Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed to visualize the incorporation of BS into various polymeric matrices and its behavior during exposure of tablets to SGF and SIF (**figure 5.5**). The CMS and CMS-CHI tablets (data not shown) showed similar structures upon freezing and lyophilization.

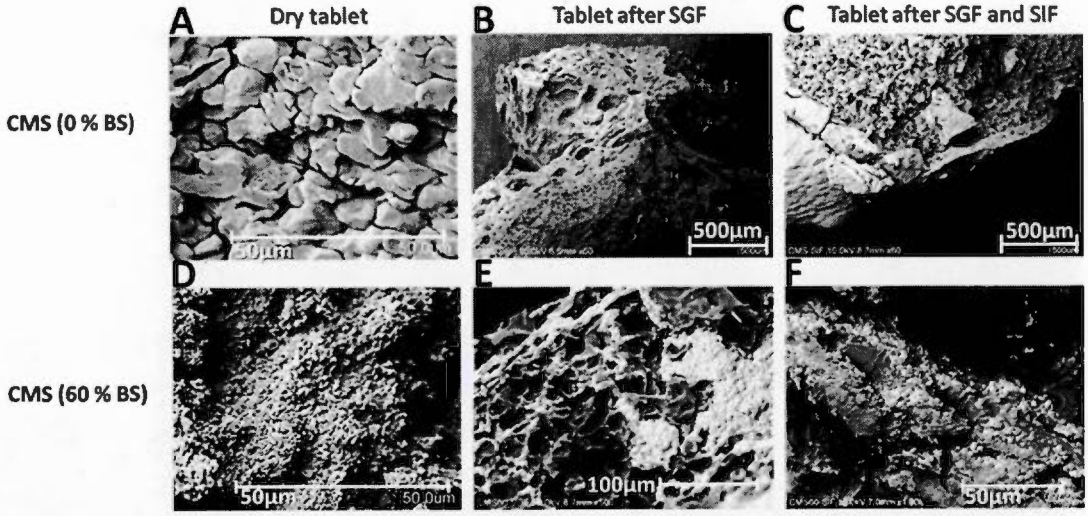


Figure 5.5 Scanning electron micrographs of tabelts based on CMS alone (A-C) and with 60% BS (D-F), dry (A, D), after 2h in SGF and the frozen and lyophilized (B, E) and after 2h in SGF followed by 2h in SIF and the frozen and lyophilized (C, F).

The initial grain morphology of CMS (**figure 5.5A)** is similar to that of native starch (not shown). The fine BS powder was clearly observed (white dots) in D, E and F pictures meaning that the BS remained in the matrix even after the tablet exposure to SGF and SIF. This is an important finding for further usage of the BS for *in vivo* traceability of the tablets. Irrespective to the polymer used, all micrographs illustrated the widespread distribution of BS in the entire matrices even after their passage in various fluids.

5.3.3 Tablets characterization in simulated gastric and intestinal fluids

BS loading was kept constant at 40% and various grades of HPMC were investigated using the disintegration test USP<701>. It was found that the disintegration time of the tablets was related to the chain length (viscosity) and

hydrophilicity/hydrophobicity ratio (E or K grade) of the HPMC, where the E grades present a higher content of methoxy groups generating more hydrophobicity and lesser ability to form hydrogen association. These parameters were used as tools to adjust disintegration times of tested formulations. For further *in vivo* tests, traceability of the tablets by X-ray in various segments of the beagle GIT was the main objective and the K100M HPMC having the longest disintegration time *in vitro* (**table 5.2**) was selected for the preparation of a non-disintegrating tablet.

Tableau 5.2 Disintegration times of tablets based on various formulations following USP <701> procedure.

FORMULATIONS				Disintegration time (DT) after exposure to 2h SGF and SIF
BS	Polymeric matrix		BSA	
40%	-	K100M 60%	-	> 11h *
40%	-	K100M 30%	30%	>7h
-	CMS 100%	-	-	2h
-	CMS 50%	CHI 50%	-	3h
40%	CMS 18%	E4M 12%	30%	3h30 *
-	CMC 100%	-	-	3h
40%	CMC 18%	E4M 12%	30%	5h *

*Formulations retained for further *in vivo* administration

Then, 30% loading of BSA as model was added to the tablets in order to simulate formulations with bioactive agents as therapeutic enzymes or probiotics for oral administration. For intestinal targeted release, a formulation with erosion delay of about 5h was planned. At high BS loading, the DT can be modulated by the HPMC type in regards to molecular weight (viscosity) and functional groups of hydroxypropyl and methyl ratio (grade E or K).

Consequently, the HPMC E4M was used as a matrix forming agent and CMS or CMC (with pH-dependent features) were used to modulate tablets disintegration (table 5.2). For instance, the addition of CMC may reduce the disintegration time from more than 8h (table 5.1) to 5h (table 5.2).

Tableau 5.3 Disintegration times of formulations containing 30 % excipient in various ratios. The formulations were made of different ratios of CMC:HPMC comparing 3 grades of HPMC: K4M, K100M and E4M. Tablets also containing 40 % BS and 30 % BSA were tested in the disintegration bath USP for 2h in SGF followed by up to 7h in SIF.

Excipients ratio (30%) %CMC / %HPMC	Disintegration time (h)		
	HPMC		
	K4M	K100M	E4M
30 / 0	-	2	-
25 / 5	-	4.5	-
20 / 10	4.5	5	-
18 / 12	5	5.25	5
16.5 / 13.5	5	6.75	5
15 / 15	5	7	-
13.5 / 16.5	5	-	5
12 / 18	5	-	5
10 / 20	5	7	-

A formulation with a DT of 5h was designed by varying the HPMC type and the disintegrant CMC loading between 10-30% (**table 5.3**). The K100M grade exhibited more variability and K4M hydrated tablet was harder than E4M. Evaluation of texture of the gels and the DTs conducted to the selection of E4M grade.

Gastric resistance of the tablets in SGF was monitored by bromocresol green pH indicator (yellow in acidic media, and blue in neutral fluids). First, it is worth to mention that all the retained formulations with CMC, CMS and HPMC presented a dry core, with or without BS, suggesting a very good protection against gastric acidity. The orange layer corresponds to the penetration of SGF while the blue layer is related to the hydration front in SIF. Only the outer layer exposed to SGF appeared as acidified (orange) in case of tablets formulated with CMS (**figure 5.6A**) and with HPMC K100M (**figure 5.6C**). The CMC (with a higher substitution degree with carboxylic groups) presented a certain protection against acidity in SGF, even at the level of outer layer

(**figure 5.6B**). Then, for tablets with neutral HPMC matrix exposed to SIF, the outer layer became all blue (**figure 5.6C**) whereas the tablets with anionic CMS and CMC are blueish but still presented some yellow traces suggesting a certain time for deprotonation in neutral intestinal medium.

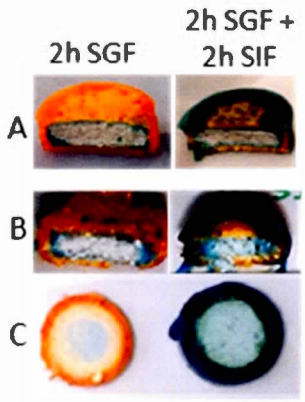


Figure 5.6 Gastric protection and fluid penetration of tablets containins bromocresol green indicator (1% w/w) as shown by axial and diametral cuts after exposure to 2h SGF (left) and 2h SGF+ 2h SIF (right) formulated with CMS 100% (A), CMC + 10% BS (B) and HPMC K100M with 40% BS (C).

5.3.4 Image analysis of the opacifying strength

Before oral administration to the animal model, preliminary settings of the X-ray equipment and selection of BS loading was done on dry tablets by taking radiographs at various exposure parameters. A comparison of the opacity obtained with various amounts of BS and for different tablet shape is represented in **figure 5.7A**. The oblong and the round (9.54 mm) tablets were equivalent in opacity but the large round (12 mm diameter) tablet was thinner and the opacity lower than that of the other two types. In **figure 5.7B**, 10% to 40% of BS in tablets of 9.54 mm diameter were compared at different X-rays settings with the result that the 30 and 40% loadings had optimal values for any parameters. In **figure 5.7C**, the tablet with BS was compared to a tablet with calcium chloride. The BS showed a better opacity for the same weight ratio.

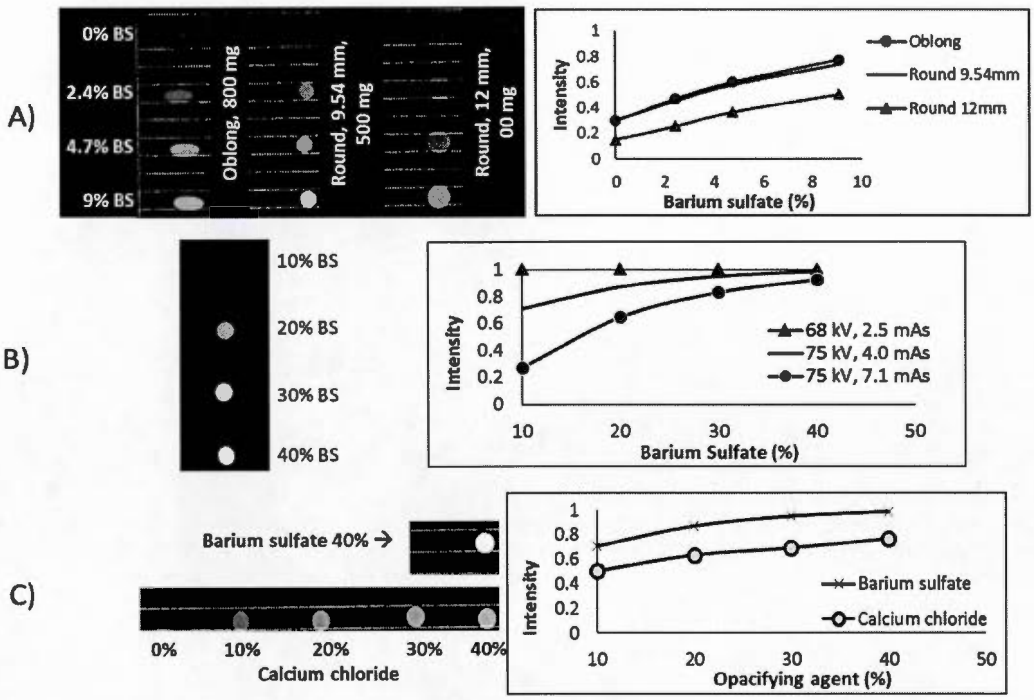


Figure 5.7 Radiographic evaluation of tablets. A): the opacity of three tablet shapes (small and large round and oblong) containing various barium sulfate (BS) loadings; **B)**: the opacity at a higher range of BS loadings for the round tablets (9.54 mm) and with different settings of X-ray equipment; **C)**: the opacity of tablets with calcium chloride compared to that of BS.

5.3.5 *In vivo* testing

A preliminary *in vivo* evaluation was done using a tablet based on HPMC K100M and 40% BS (one trial). Then, the two different formulations (with CMC or CMS) designed to disintegrate beginning with the upper intestine were administered, twice each. **Figure 5.8** illustrates the *in vivo* transit on beagle model of each tablet formulation. HPMC K100M tablet preserved almost an intact shape throughout the whole GI transit. In contrast, CMC formulations were disintegrated between 1h30-2h whereas CMS formulations disintegrated between 2h-4h30. It was also noticed that the *in vivo* dissolution times for CMC and CMS formulations were lower than *in vitro*.

Impact of various media with different pH on disintegration times

To understand the differences between *in vitro* and *in vivo* data, formulations were tested in SIF only. The corresponding disintegration times are reported in **table 5.4.** For the same BS and BSA loadings, tablets based on different excipients were made with a binder (HPMC) and a pH-dependent polymer (CMS or CMC). They showed over 7h of integrity in the classical SGF-SIF system, but in the SIF medium only, the DT decreased to 4h. Similarly, formulations containing CMS or CMC disintegrated in 1h in SIF only compared to 5h in SGF-SIF media.

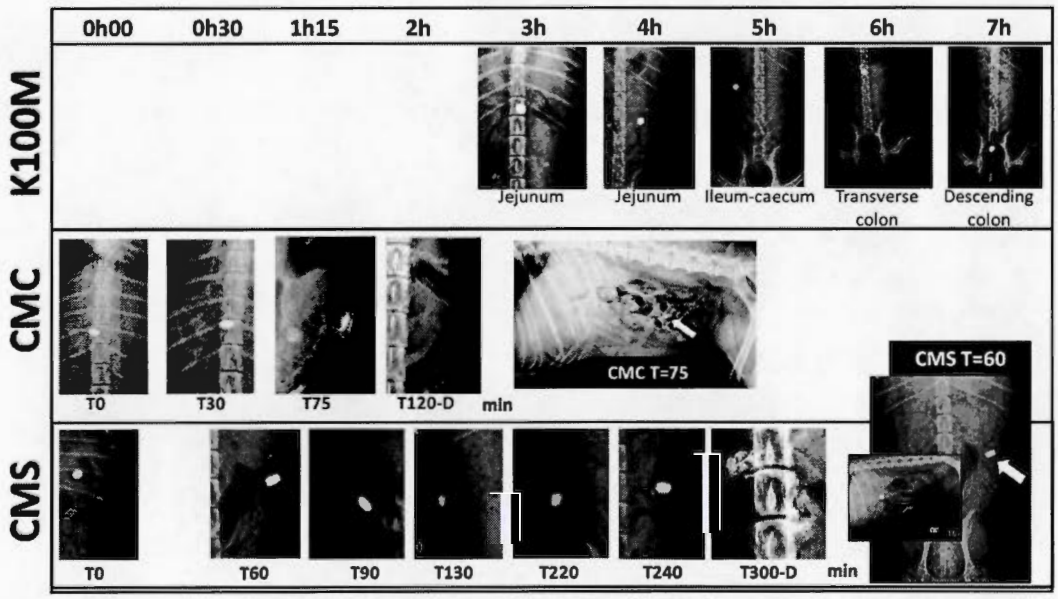


Figure 5.8 ***In vivo*** **follow-up of selected formulations containing 40% BS.** CMC stands for the formulation with CMC 18%, E4M 12%, BS 40% and BSA 30%. CMS stands for: CMS 18%, E4M 12%, BS 40% and BSA 30%. The disintegration time is labelled with D.

Based on these findings, tablets were incubated in various media at different pH values (**table 5.5**). In previous reports, BS was added in formulation by reducing or replacing the content of the active agent (Dev *et al.*, 2011; Kshirsagar *et al.*, 2011;

Yassin *et al.*, 2010), added with the active (Senthil *et al.*, 2010; Tugcu-Demiroz *et al.*, 2004, 2007) or formulated as a core for coating evaluation (Momin et Pundarikakshudu, 2005; Saphier *et al.*, 2010) . It was found that a formulation with 40% CMC instead of BS had almost the same DT in the SGF-SIF system (3h30 versus 3h45 in **table 5.5**).

Tableau 5.4 Disintegration times of tablets kept 2h in SGF and then SIF compared to exposure to SIF only. All formulations contained 40% BS and 30% BSA.

Polymers		Disintegration time		
		SGF and SIF	SIF only	*In vivo*
-	K100M 30%	>7h	4h	-
CMS 18%	E4M 12%	3h30	1h	2h-4h30
CMC 18%	E4M 12%	5h	1h	1h30-2h

The BSA was then replaced with catalase and the DT of tablets was 6h or higher and tablets were almost intact. If replaced with ibuprofen (low solubility), the DT was closer to the initial DT of 3h30. When the pH was increased, the effect was the same: the DTs were reduced at about half.

Tableau 5.5 Correlating in vitro disintegration times of tablets containing BS with CMC as substitute. Each test was done in triplicate.

Disintegration media	Content of tablets			
	BS (40%)	**CMC (40%)**	**CMC (40%)**	**CMC (40%)**
	E4M (12%) CMS (18%)	E4M (12%) CMS (18%)	E4M (12%) CMS (18%)	E4M (12%) CMS (18%)
	BSA (30%)	**BSA (30%)**	**Catalase (30%)**	**Ibuprofen (30%)**
pH 1.2/6.8 (SGF/SIF)	3h30	3h45	>6h	3h15
pH 3.9	3h-3h30	2h	3h15	2h
pH 5.1	2h	2h	3h	2h
pH 6.8 (SIF)	1h	1h30-2h	3h	1h30-2h

5.4 Discussion

This study was focused on developing a new oral dosage form containing barium sulfate (BS) as contrast agent permitting to follow the shape of tablet dosage forms and their advancement along the GIT on a beagle dog model. The dosage was designed as a coating-free monolithic tablet offering gastric protection features and controlled disintegration at intestinal neutral pH and in the presence of pancreatic α-amylase. Correlations of various *in vitro* test performances with data obtained in the canine model were made by varying the type of matrix-forming polymeric excipients.

Impact of barium sulfate incorporation into the tablets

Structural studies of the dry tablets - In presence of moderate BS content, all matrices except CMC showed an increase in hardness. At low loading, BS is known to improve the strength of materials; for instance, when used in a range of 8-13%, the BS improves cement hardness, but over 30%, the hardness is decreased (Martínez de Arenaza *et al.*, 2015). The low resistance to crushing of the CHI tablet may be due in part to its flake morphology. In contrast, CMS generated the highest hardness. It was also hypothesized that the CMS V-helices could better stabilize the network by hydrogen association.

XRD analysis showed that the BS crystalline network was conserved after compression (**Figure 5.3**). This feature facilitates the use of radiography for transit follow-up of orally administered tablets with BS. Its crystallinity and its high density support its use as a good opacifying agent. The CMS had broad peaks whereas CHI was the only one exhibiting a peak at 32.5° (2θ) that seems to disappear in presence of BS. Indeed, the CHI is known to form complexes with various alkaline earth cations as strontium(II) (Piron et Domard, 1998), present in the atomic group II of periodic table, as barium. CHI can also react with anions as sulfate (Al-Remawi, 2012). These possible

interactions with BS could explain the disappearance of CHI peak associated to the loss of order.

IR Characterisation – The RAMAN spectra of BS showed multiple minor peaks and a major one at 985 cm^{-1}. The disappearance of two peaks (1628 and 1542 cm^{-1}) from CHI spectrum in presence of BS (**Figure 5.4**) could be related to possible electrostatic interferences between BS and amine function. This may also be related with the disappearance of the peak in DRX. As CHI showed modification of the amine corresponding bands, further investigation would be required to elucidate the nature of this interaction. Based on these observations, formulations with CHI were discarded for later studies because of artefact risks. The spectra recorded for the anionic polymers (CMC and CMS) with or without BS were similar (data not shown).

***In vitro* simulation of the GIT** - In order to better mimic *in vivo* conditions, the disintegration properties of tablets were also studied in SGF and SIF in a disintegration bath (USP <701> method) as presented in **Table 5.1**. Tablets with 40% BS were all disintegrated after 3 hours except HPMC (K100M, E4M and E10M). All HPMC grades were able to incorporate up to 80% opacifying agent, with DTs of about 8h.

Concerning tablet integrity, HPMC K4M and K100M without BS did not disintegrate, even after 20h. At 80% BS loading, tablets with K4M had a slurry consistency in SIF, which could be of interest to replace BS suspension for diagnostic applications. Neutral matrices exhibited better stability than ionic matrices upon increasing BS loading. The HPMC has small side chains (hydroxypropyl and methyl) that seem to modulate in different ways the inter-molecular contacts and hydrogen association. Differently, the CMC have only carboxymethyl groups that become hydrated and increase the solubility. The CMC has a non-branched shape that may have less contacts between glucose units in comparison with those of V-helix of CMS, explaining the faster erosion rate of CMC.

The CHI is an interesting excipient but its interaction with BS may alter the results for mechanical stability of tablets and for disintegration times. For these reasons, CHI was eliminated for the rest of this study.

Since no significant differences in tablet opacities were found *in vitro* (**Figure 5.7A and B**), round tablets (9.54 mm diameter) with 40 % BS, allowing a good X-ray visibility, were selected for the *in vivo* trials. Comparison of BS with calcium chloride as tracer (**Figure 5.7C**) showed that BS is more efficient. Also, calcium chloride is hygroscopic and difficult to handle.

Another investigated aspect was related to a possible diffusion of BS out of the tablets. The SEM showed that BS remained within the tablet matrix after its exposure to SGF and SIF (**Figure 5.5**). On the radiographs, no cloudy tails behind the tablets were observed prior to their disintegration (**Figure 5.8**). It was also noticed that tablets opacity was maintained throughout the entire GIT transit, suggesting that BS is well entrapped in the matrices.

Gastric protection - Incorporation of 1 % bromocresol green in the powder blend resulted in coloration of the tablet outer layer in SGF. The gastric protection efficiency was clearly proven by the tablet cores, still dry after 2h incubation in SGF (**Figure 5.6a, b and c**). For the anionic matrices CMS and CMC, the yellow color had not disappeared after 2h exposition to SIF meaning that the outer layer exposed to SGF is not easily neutralized by deprotonation/ionization in SIF. These anionic matrices formed thin but compact gel layer in SGF. Differently, the HPMC K100M generated a thicker gel but still protecting the core of tablets. It is interesting that the HPMC, which is slightly hydrophobic, was protective by the formation of a thicker gel, rather than protonated layers formed by the anionic matrices (Ispas-Szabo *et al.*, 2016).

Selection of a resistant tablet with 40 % SB - It was observed that the formulations with HPMC K100M (with the highest viscosity) and 40 % BS allowed

the longest DT, the tablets maintaining their integrity for more than 11h in the SGF-SIF system. This non-disintegrating formulation was specifically designed in order to validate the performances of the X-ray equipment for the present study in the dog model. It was important to ensure that the tablets can be followed *in vivo* along the entire GIT. It is known that the *in vivo* behavior is an interplay of characteristics of dosage form (size and type) and physiological features (body mass and feeding time) that can influence the transit (Snoeck *et al.*, 2004). Consequently, the same shape and tablet mass as well as the same adult beagle dog were used. For this reason, in order to minimize variability, the dog was fed in the evening prior the experiment.

Once administered to the beagle dog, the tablet with HPMC and BS (500 mg) remained entire exhibiting a behavior similar to that observed *in vitro* (**Figure 5.8**). After 3h, the tablet had already passed the stomach and was still intact with observable initial round shape. After passage to the colon (7h), the shape was kept but the edges were not as sharp, probably due to a slight swelling. With these tablets, the *in vivo* data showing the shape maintaining more than 7h (until evacuation) fit well with the *in vitro* behavior of these tablets, with no disintegration for at least 11h. This good correlation was useful for the operation procedure of X-ray equipment for the *in vivo* follow-up of formulations targeting specific segments of the GIT.

Administration of intestine targeted formulation - *In vivo* administration of formulations containing CMC (CMC-HPMC-BS-BSA) showed that disintegration was completed approximately 2h after administration. The tablets transited through the stomach and disintegrated quickly in the small intestine. A possible explanation for the lower DTs than *in vitro* could be attributed to the pH. Gastric pH of beagle dogs is known to be moderately higher with a mean of 3.5 (Hatton *et al.*, 2015) but varying from 0.9 to 6.5 (Arndt *et al.*, 2013). To observe the impact of the pH on the DTs of the selected formulations, the disintegration test was done in the SIF only (pH 6.8). It showed lower DTs for all tablet tested (**table 5.4**). The various pH reported for beagle

dogs underline the importance of using pentagastrin prior to administration of a formulation, or to measure gastric pH if no pentagastrin is used (Arndt *et al.*, 2013).

A similar formulation was made but with CMS instead of CMC. The DTs were of 3h and 5h *in vivo,* fitting well the *in vitro* studies (3h30). The *in vitro-in vivo* results for the CMS-based formulation better correlates than with CMC.

An explanation to the difference between the *in vivo* and *in vitro* results could be the presence of bicarbonate in the intestine, compound that was replaced by phosphate in the *in vitro* simulation (Snoeck *et al.*, 2004). Also, the mechanical motility is not greatly reproducible in such tests. However, the preliminary administration (HPMC K100M + 40% BS) was mostly intact when it reached the colon. The difference with this resistant tablet and the intestine targeted formulations is that the CMC and CMS are ionic excipients and their solubility could be enhanced by pH changes. Possible causes for discrepancy with the simulation model could be that the gastric pH of the dog was more neutral, or the gastric residence time of tablets may have been shorter. For the intestine targeted formulations, radiographs were taken sooner. It appears that at T75 for CMC and T60 for CMS, the tablet had already passed the stomach. This may have major impact on the disintegration times of formulations with pH-sensible excipients. The reasons for this shorter transit time may be relate to the fasting of the dog or to the modification of is meal time but the canine specie is known to have gastric transit that may sometimes be faster than that of human (Aoyagi *et al.*, 1992).

To carefully assess the results observed *in vivo*, further investigation would be required as a precise monitoring of the gastric residence time with an increased quantity of radiographs, pH adjustment and an increased number of administration trials. This is especially needed for pH sensitive formulation. For example, *Sagawa and Al.* measured the gastric pH and transit time with a telemetric capsule in 16 beagles and found an average fasted gastric pH of 2.05 with a transit time of 1.4h (Sagawa *et al.*,

2009). With the same technique, 1.2 ± 0.4h was also reported for humans and dogs (Sutton, 2004). This shows that the beagle is a great model and that the incubation time proposed by the pharmacopeia to simulate the human gastric transit could be adjusted. This could also apply to a simpler beagle gastric transit modeling method with a lower residence time and slightly higher SGF pH, between 2 and 3.5 (*i.e.* preliminary to a tortuous but complete fasted state SGF for dog with adjusted osmolality, multiple buffers, bile salts, phospholipids and fatty acids (Arndt *et al.*, 2013)).

The tablets for the comparison between the anionic polymers CMS (home-made) and CMC (commercial) as excipient showed different behaviors in simulated digestive fluids and *in vivo* trials. In the GIT transit simulation without BS, the CMC tablet offered a good protection in SGF but in presence of BS, the tablet erosion increased. An hypothesis is that the CMC, with its linear morphology, allows less hydrogen interactions than CMS and that facilitated the penetration of the fluids which caused the tablet to erode. In **Table 5.5**, the BS was replaced by CMC in the formulation with BSA and showed similar DT. It is supposed then that BS can substitute a low hardness excipient with not much impact on the disintegration time. The increasing pH had the same effect on formulations with active contents as BSA, catalase or ibuprofen. This indicates that the DT is mainly related to the E4M-CMS solubility and hydrogen bonding properties. This also indicates that the presence of a drug with low solubility would not have much impact on the DT of a formulation with BS, even if the molecular weight is smaller than a protein. The high DT of catalase can be explained by its high MW of about 240 kDa, compared to BSA of 66 kDa.

5.5 Conclusion

Imaging techniques could be great tools for formulation developmental studies. In the particular case of orally administrated bioactive agents (*i.e.* enzymes) targeted to the distal parts of the GI required to treat locally inflamed mucosa, the formulation is

very challenging. The present study investigated oral solid dosage forms containing BS as opacifying agent and a model bioactive molecule (BSA) that should be protected from gastric acidity. The challenge of using BS in tablets consisted of finding a good balance between the loading not too high to affect the tablet mechanical properties but enough to ensure a good contrast *in vivo,* allowing tablet traceability. It was found that matrices based on a mixture of neutral (HPMC) and anionic (CMS) polymeric excipients can ensure a good gastric protection even without coating and can be modulated to release bioactive agent to the colon. The proposed formulations containing 30% matrix, 40% BS and 30% bioactive agent combined good mechanical properties with gastric protection offering also a good *in vivo* traceability of the tablet. The X-ray imaging studies on a fasted beagle dog model allowed the selection of optimal formulation and was very useful for *in vitro in vivo* correlations. The *in vivo* data suggested that for the beagle model, the tablets disintegration times were slightly lower than the *in vitro* predictions. It is known that the dogs have a little shorter GIT than humans with different fluids volume, composition and microbiota but the disintegration times of the tablets seemed to be mainly influenced by gastric pH and residence time.

Based on these findings, the tablets containing BS combined with X-ray technique follow-up could be considered as an alternative to scintigraphy with the advantage of using standard equipment and materials. To the best of our knowledge, the present study is the first to propose usage of BS uniformly dispersed in monolithic tablets with high molecular weight bioactive agents and *in vitro-in vivo* correlation for intestine-targeted delivery.

Acknowledgments - Thanks are due to Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), to the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) of the Montreal University (a FRQNT cluster) and to Courtois

Foundation for funding this work. We wish to thank also CIMBAR and Colorcon for the providing BS and HPMC materials and Mr. M. Preda for the DRX analysis.

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le but de cette étude était de voir l'impact de l'agent opacifiant sur différentes matrices pouvant former des comprimés. Il était intéressant aussi de suivre par rayons X un comprimé oral monolithique dont la solubilité dépend du pH. Pour cela, le sulfate de baryum (SB) a été utilisé comme agent opacifiant. Comme c'est un sel insoluble qui ne se compresse pas bien, son incorporation dans des comprimés aurait pu influencer leur dureté et leur comportement durant le transit dans le tractus gastro-intestinal (TGI). De plus, la concentration en SB pourrait influencer la visibilité aux rayons X. Les temps de désintégration (TD) de différents excipients (neutres, anioniques, cationiques) pouvant former des matrices ont donc été comparés pour étudier les interactions possibles avec le SB. La concentration optimale en agent opacifiant devrait permettre une bonne visibilité sans avoir trop d'impact sur les TD.

L'amidon modifié est utilisé depuis longtemps comme excipient, *i.e.* le glycolate d'amidon sodique, disponible commercialement, possède un haut degré de substitution (DS) et est réticulé, ce qui lui confère des propriétés de super désintégrant. Le carboxyméthylamidon (CMA) est relativement récent. Il n'est pas réticulé et son DS peut être modulé en laboratoire, ce qui permet de modifier sa solubilité. Le CMA a déjà montré une bonne aptitude à former des matrices monolithiques pouvant transporter des agents biologiquement actifs (*i.e.* enzymes thérapeutiques, probiotiques). Dans le but de voir le comportement du CMA *in vivo*, il a été formulé en comprimé contenant

le SB et comparé avec la carboxyméthylcellulose (CMC) commerciale, un polymère dont la solubilité dépend aussi du pH.

6.1 Caractérisation à sec des comprimés

Pour comprendre les changements possibles dans le comportement des comprimés pendant la simulation du transit et pendant le transit *in vivo*, il était nécessaire d'étudier les changements pouvant subvenir entre les matériaux après la compression. Les méthodes de caractérisation classiques pour des comprimés ont été utilisées et seront étayées plus bas.

Paramètres de compression – Le temps de compression utilisé (10s) a été comparé à un plus grand temps (300s) pour divers comprimés et il y n'avait pas ou peu d'impact sur le temps de désintégration ni sur la dureté. Différentes forces de compression ont aussi été comparées et n'influençaient pas ces paramètres.

Dureté – La dureté des comprimés (*crushing strength*) a été testée en triplicata pour différentes concentrations de SB et différents types de matrices (HPMC, CMC, CMA, CHI et CMA:CHI). La dureté d'un comprimé représente en fait les interactions entre les excipients. Plus il y aura de contacts et de pont hydrogène entre les molécules, plus le comprimé sera résistant aux forces mécaniques. Les matrices à base de CMC étaient les plus fragiles, suivies par le CHI. Il se pourrait que le caractère ionique de ces excipients puisse diminuer la formation des ponts hydrogène. Dans le cas du CHI, sa structure en flocon semble nuire au processus de compaction. Ainsi, la CMC et le CHI deviennent rapidement friables en augmentant la concentration en SB. Les matrices de CMA étaient bien plus dures que celles obtenues avec les autres excipients (**figure 5.2**). Cela pourrait être attribuable à la structure en hélice du CMA qui possède une certaine flexibilité, comparée à la cellulose (CMC, HPMC) qui est linéaire et rigide.

Spectroscopie infrarouge (IR) – Il pourrait être possible d'observer les modifications au niveau du sulfate de baryum (*i.e.* le changement de distance entre le sulfate et le baryum) en suivant les changements des bandes FTIR (Bishop *et al.*, 2014; Lane, 2007; Miyake *et al.*, 1978). Toutefois, en présence des polymères (CMA, CMC, CHI), les spectres sont encombrés et difficiles à analyser. Les différentes techniques IR disponibles ont été utilisées afin de voir s'il était possible d'avoir des spectres plus clairs.

Essais sur les différentes techniques IR - Pour voir s'il y avait intéraction entre le SB et les excipients ioniques formant la matrice, les spectres des mélanges de poudre ont été comparés avant et après compression pour le CMA, la CMC et le CHI. La technique FTIR par transmission utilise le KBr dans lequel l'échantillon est incorporé à une faible pourcentage pour former une pastille transparente. Pour analyser les comprimés, ceux-ci ont été broyés, incorporés au KBr et comparé avec le mélange des poudres sans compression. Il n'y avait pas de différence remarquable. Il se pourrait que dans la pastille, les molécules soient trop espacées pour pouvoir observer des intéraction, mais aussi, les spectres étaient bien encombrés à cause des polymères (CMA et CMC).

Afin de vérifier si une autre méthode permet de donner moins de pics, la technique de réflectance totale atténuée (*ATR, attenuated total reflectance*) a été utilisée. Contrairement à la transmission où le faisseau passe à travers la pastille, dans ce cas l'échantillon est posé sur un cristal et le faisseau sera réfléchi plusieurs fois sur le cristal et l'échantillon. Cela a pour effet de maximiser l'impact de la structure (par exemple la taille des particules) sur l'intensité des bandes. Les poudres peuvent donc être analysées directement sur le cristal mais aussi les comprimés. Déposer le comprimé directement sur le cristal donne par contre un moins bon contact. Effectivement, l'analyse des poudres avant compression, des mélanges de poudre et des comprimés broyés montrent que les intensités changeaient mais il n'y avait pas de déplacement de

bande significatif. Les spectres étaient encore encombrés alors la spectroscopie RAMAN a été utilisée.

En spectroscopie vibrationnelle, la technique RAMAN semblait adaptée car le SB montrait moins de pics. Les comprimés de CMC et CMS n'ont pas montré de variation en présence du SB. Par contre le CHI après compression avec SB perd 2 pics (**figure 5.4**). Le pic à 1628 cm^{-1} est attribué à la vibration dans le plan du groupe N-H de l'amide, ce qui confirme la présence résiduelle de groupements N-acétyles (Zając *et al.*, 2015). Ce pic semble avoir une épaule à gauche qui correspondrait au mode vibrationnel d'élongation du C=O de l'amide à 1658 cm^{-1}. Cette épaule est faible lorsque le CHI est hautement N-déacétylé. Le pic à 1542 cm^{-1} est attribuable à la déformation dans le plan du groupe NH_2. Il semblerait donc que les amides résiduelles et les amines soient impliquées dans une forme d'interaction avec le SB. Davantage de caractérisations sont requises pour élucider la nature de ce phénomène mais il est possiblement relié à une certaine complexation CHI:SB. Par exemple, il est rapporté qu'en solution acide, le CHI peut être réticulé avec des anions sulfate (Al-Remawi, 2012). Le CMA et la CMC semblent donc être des excipients ioniques intéressants pour former des matrices pouvant incorporer le SB. Le CHI nécessitait une analyse plus approfondit et sera mis de côté pour une étude future.

Cristallinité des comprimés par diffraction des rayons X **(DRX)** - La DRX permet d'analyser directement la cristallinité des comprimés. Elle fut effectuée sur les comprimés avant hydratation (**figure 5.3**) pour observer l'effet de la compression. Lors de la compression, les poudres des excipients étaient sèches et la pression modérée, peu de réarrangement étaient possibles. De ce fait, la cristallinité des comprimés sans SB semble très faible, peu ordonnée. Par contre en présence de SB, le diffractogramme devient bien chargé. Le SB, sous forme de petits segments de cristaux, est très cristallin. Il garde sa haute cristallinité après compression et le diffractogramme observé est identique avec ou sans excipient. Pour obtenir un comprimé contenant seulement le

SB. Il fut nécessaire d'ajouter une petite quantité d'eau car il ne se compresse pas bien. Le seul excipient parmis ceux testés à montrer un pic fut le CHI à 32.5° 2θ, sur le diffractogramme du comprimé de CHI seul (**figure 5.3A**). Le CHI est connu pour complexer divers anions comme le carbonate de strontium (Piron et Domard, 1998), le strontium étant dans la même catégorie des métaux alcalino-terreux que le barium. Le CHI peut aussi être réticulé par les anions sulfates (Al-Remawi, 2012). La disparition du pic du CHI pourrait donc être causée par une forme de complexation ou de réticulation avec le sulfate du SB. La cristallinité des polymères est donc très faible et celle du SB est très forte et n'est pas influencée par la présence des polymères. Pour étudier d'avantage l'incorporation du SB dans les matrices, la microscopie électronique à balayage a été utilisée.

Observation des comprimés avant et après l'hydratation par microscopie électronique à balayage (**MEB**) - Les comprimés secs et hydratés de CMA et de CHI avec et sans SB ont été observés par microscopie électronique à balayage (**figure 5.5**). Les comprimés secs ont montré que le SB garde sa forme de poudre après compression. Celle-ci se loge bien entre les structures granulaires de l'amidon ou floconneuses du CHI. Les comprimés ont aussi été observés après leur passage dans les fluides digestifs simulés. Après 2h dans le fluide gastrique simulé (**FGS**) et 2h dans le fluide intestinal simulé (**FIS**), le CMS et le CHI forment un gel. Pour l'observation, ils ont été congelés et lyophilisés, ce qui a formé un réseau poreux où le SB était déposé dans les cavités. Il est intéressant de noter que même si le SB ne se lie pas à la matrice, il est insoluble et alors ne diffuse pas à l'extérieur du comprimé.

L'étude de l'opacité de différentes formulations par RX (**figure 5.7**) souligne que le SB est plus opacifiant que le $CaCl_2$ en terme de masse. Elle a aussi montré qu'un comprimé large mais plat perdait significativement de son opacité car l'épaisseur était réduite. Pour un comprimé cylindrique de largeur et épaisseur semblable, l'opacité plafonne à 40% de SB pour les paramètres testés.

6.2 Simulation du TGI *in vitro*

La pharmacopée propose différents modèles de simulation du transit dans le TGI (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2010). D'abord, les fluides gastro-intestinaux sont simulés avec le fluide gastrique simulé (FGS) et le fluide intestinal simulé (FIS). Pour simuler le transit dans le TGI de l'humain, le comprimé doit être immergé 2h dans le FGS puis le FIS est ensuite utilisé jusqu'au temps voulu. La pharmacopée suggère aussi l'utilisation d'appareils de simulation qui produisent un mouvement mécanique et gèrent la température. Entre autres, le bain à dissolution (Apparatus #2, USP <711>) offre une agitation par hélice et une température controllée. Il est surtout utilisé pour l'étude de la libération des agents actifs. Le bain désintégrant (USP<701>) fonctionne par immersion répétée d'un cylindre dans lequel le comprimé est placé. Il est muni d'un dispositif de contact mécanique simulant le péristaltisme : un disque de polymère flottant qui entre en contact avec les formulations lorsque le panier est soulevé hors du fluide d'immersion. L'inconvénient de tels dispositifs est qu'un nombre limité de comprimés peuvent être testés en même temps. Les études préliminaires des formulation ont donc été faites sur un agitateur rotatif à la température ambiante. Les comprimés ont été placés dans des tubes de 50 mL avec 40 mL de fluide simulé et agités à 40 rpm (environ une inversion toute les deux secondes). Les temps de désintégration des comprimés ont été comparés avec les différentes méthodes.

Dans le bain à dissolution #2 (USP<711>), il survient des contacts avec l'hélice, mais comme le volume de solution est grand, les contactes sont doux et moins fréquents que dans le bain désintégrant. Par exemple, le comprimé contenant le CHI ou HPMC de tous grades auront tendance à tenir plus de 12h (20h et plus pour HPMC) dans le bain dissolution ou dans l'agitateur rotatif tandis que dans le bain désintégrant, ceux contenant du CHI ont été désintégrés en 3-4h et seulement les HPMC de haute viscosité

tiendront au moins 8h (**Tableau 5.I**). Le bain désintégrant (USP <701>) devrait génèrer des résultats qui devraient être plus près de la réalité qu'avec l'agitateur rotatif.

Formulation d'un comprimé résistant plus de 8h - Afin de faire une première administration qui serait observable tout au long du transit, un comprimé résistant plus de 8h et contenant 40% de SB fut conçu. Comme les matrices neutres étaient plus résitantes aux tests de désintégration (**tableau 5.I**), la HPMC fut sélectionnée. Il existe différents grades de HPMC. Deux types de grades ont été testés, K et E, qui sont différenciés par le ratio de substitution. Tandis que les deux contiennent 10% du groupe hydroxypropyl, le grade E contient 7% de plus du groupement méthyl, ce qui le rend moins polaire que le grade K. Les grades sont ensuite nommés selon leur viscosité : HPMC K100M signifi que la viscosité est de 100 000 cps et que le grade est K.

Les duretés des comprimés obtenus ont été comparées (**figure 6.1**) et les grade K ont montré des valeurs plus grandes. Il est intéressant de noter que la diminution de la polarité fait diminuer la dureté finale du comprimé.

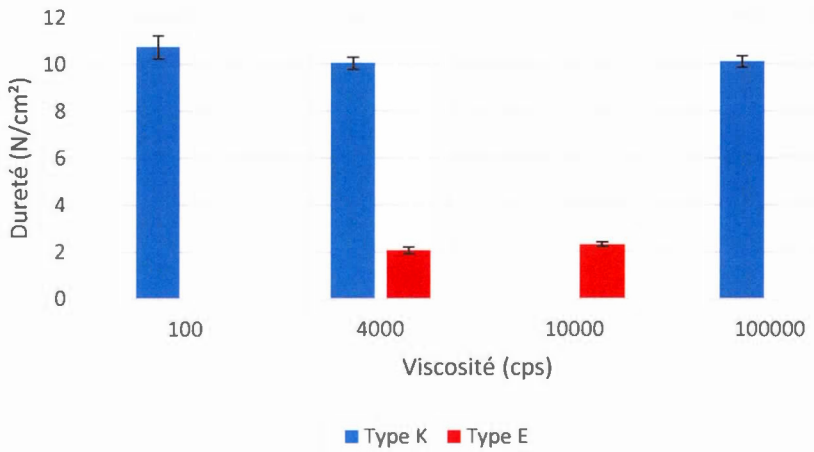


Figure 6.1 Dureté des comprimés à base de différents grades de HPMC et contenant 40% de SB en fonction de leur viscosité.

Ces mêmes formulations ont été testées dans le bain désintégrant avec le system FGS/FIS (**figure 6.2**). Il est facilement observable que le temps de désintégration est directement lié à la viscosité. Comme le grade K100M a très bien résisté jusqu'à 11h, il fut choisi pour la première administration *in vivo*.

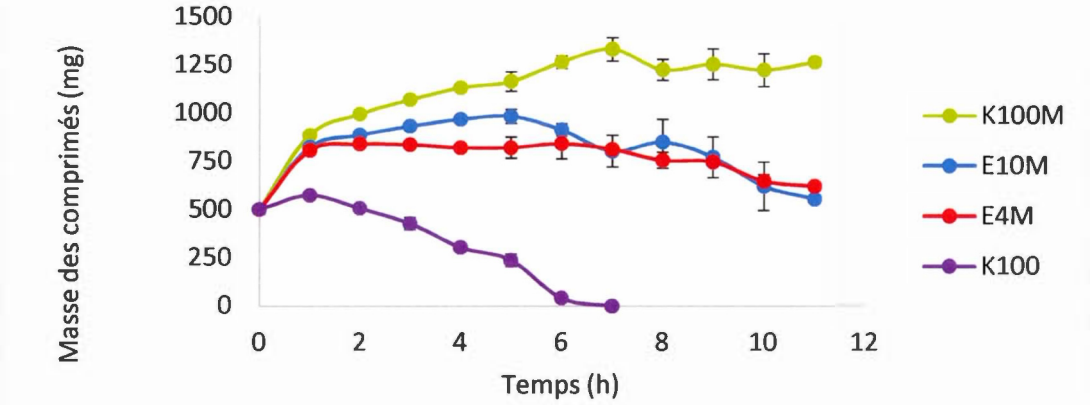


Figure 6.2 Temps de désintégration des comprimés à base de différents grades de HPMC et avec 40% SB dans les fluides simulés.

Ces résultats ont aussi servi à sélectionner des grades pour incorporer avec le CMA et la CMC pour former un comprimé dont le temps de désintégration serait d'environ 5h, ciblant les intestins.

6.3 Suivi des comprimés *in vivo*

Le comprimé non-désintégrant (HPMC K100M avec 40% SB) a bien résisté au transit intestinal dans le modèle de chien. Contenant un grade très visqueux de HPMC (K100M: 100,000 cPs), il a effectivement gonflé si lentement que les côtés pointus du comprimé cylindrique étaient encore observables après 3h post administration (p.a.) et la forme ronde encore visible après 7h (côlon).

Deux administrations contenant le CMC ont aussi été effectuées. Les deux essais ont montré que les comprimés étaient presque complètement désintégrés 1h15 p.a. (post administration) et semblaient avoir quitté l'estomac dans le même délai. Pour la même formulation mais avec le CMS remplaçant le CMC, deux administrations ont également été effectuées. À la première, le comprimé semble encore intact et peu gonflé à 4h p.a. et dissout rapidement peu après. Le deuxième semble avoir passé moins de temps dans l'estomac, il a commencé à se dissoudre plus tôt que le premier, 1h30 p.a. et est presque dissout 2h p.a., quoi qu'une trainée est encore visible après 3h. La reproductibilité de la méthode semble acceptable mais pas excellente à cause de la variabilité de l'animal.

6.4 Corrélation des temps de désintégration *in vitro* et *in vivo*

Le comprimé non désintégrant a résisté au transit *in vivo* ce qui corrèle bien avec les prévisions basées sur les résultats *in vitro*. Les comprimés contenant la CMC ont moins bien résisté au transit de l'estomac. Possiblement que le pH gastrique du chien est plus élevé que celui de l'humain préconisé par l'USP et la CMC aurait plus difficilement supporté cette variation que le CMA. Il est possible que la CMC hautement substituée et sous forme de sel agisse comme désintégrant faible et qu'un fluide plus neutre ait plus de facilité à y pénétrer que dans le CMA. Les deux essais d'administration des comprimés contenant la CMC, le SB et l'albumine de sérum bovin (**ASB**) se sont désintégrés peu après 1h15 *in vivo*, comparés à 4h *in vitro*. Pour le CMA, ils se sont désintégrés vers 2h et entre 4-5h. L'écart reste significatif et il serait nécessaire de répéter l'administration pour pouvoir déterminer le comportement réel car il est certain que les deux comprimés n'ont pas été gérés de la même façon par le modèle. Il est possible que le pH gastrique du chien ne soit pas aussi acide que celui de l'humain et du modèle de simulation. Il se pourrait aussi qu'un vidage de l'estomac ait eu lieu plus

tôt ou que l'un des comprimés ait été endommagé, peut-être pendant le transit gastrique.

Afin de vérifier l'impact du pH, les formulations administrées *in vivo* ont aussi été testées dans différent tampon. Effectivement, en diminuant l'acidité du fluide simulé, les temps de désintégration sont plus rapides. Le pH pourraient donc influencer la solubilité des polymères et du contenu actif, dans ce cas ci les protéines. En utilisant la catalase (qui a un poids moléculaire plus grand) à la place de l'albumine, la désintégration a été encore plus rapide, comme quoi le pH impact grandement la solubilité des protéines.

Comme la plus part des études de suivi par rayons X procèdent en substituant l'actif par le SB, nous avons penser faire le processus inverse pour vérifier l'impact sur le temps de désintégration. En substituant le SB avec un médicament tel que l'ibuprofène, le temps de désintégration *in vitro* dans le fluide gastrique simulé est semblable à celui obtenu *in vitro* pour les formulations qui ont été administrées.

6.5 Conclusions

Différentes matrices ont été testées afin d'incorporer le sulfate de baryum (SB). Les changements structuraux suite à la compression ont été analysés pour chaques excipients avec et sans SB. La spectroscopie RAMAN a permise de constater que deux pics du CHI disparaissaient en présence de SB, probablement du à une forme de complexation ou de réticulation avec le sulfate. La DRX a aussi montré que les comprimés obtenus avec les polymères seuls étaient peu ou pas cristallins et que le comprimé de CHI était le seul à avoir un pic, lequel disparaissait en présence de SB. Ce phénomène semble concorder avec la disparation des pics en RAMAN. Comme le CHI montrait des intéractions, il n'a pas été utilisé pour la formulation et fut mis de côté pour des études futures. Le SB a permis de suivre les comprimés sans diffuser à

l'extérieur de ceux-ci, ce qui fut appuyé par la MEB. Les analyses radioscopiques ont montré que 30-40% de SB était amplement suffisant pour permettre l'observation. Une formulation ciblant l'intestin avec ASB à 30% en plus du SB a été administrée et corrélée avec succès aux études *in vitro*.

Le SB offre donc une modalité de suivi fiable qui s'adapte bien aux différentes formulations. Toutefois, l'utilisation du même chien pour chaque étude n'a pas empêché que des différences soient observées, les duplicatas d'administrations n'étant pas très semblables pour le CMS. Il est possible aussi que le pH gastrique plus élevé aie influencé la dissolution rapide du CMC. Il pourrait donc être intéressant de comparer aussi l'administration d'un comprimé avec CMC au model chien ayant reçu de la pentagastrine, un réducteur de pH utilisé pour les chiens beagles (Arndt *et al.*, 2013).

6.6 Contributions à la recherche réalisées durant la maîtrise

Participation comme coauteur à la rédaction d'un article de revue (article en annexe)

Self-Assembling Phenomena : From Excipients to Drugs. Ispas-Szabo, P., Labelle, M.-A., Mateescu, M.A. *Publié dans: Journal of Biochemistry and Chemical Sciences (NorCal Open Access Publications)*, Vol 2017 1:28-36.

Présentation avec arbitrage (résumés publiés en annexe)

Study of barium sulfate tablets as possible tracers in inflammatory bowel diseases. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A. *The 19th Concordia Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference* (CBGRC), section *Computational and physical chemistry*, Montréal, Qc, Canada, 2016 – Présentation orale

Des comprimés de sulfate de baryum pour le diagnostic des dysfonctions intestinales. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.A. *Le 85ième Colloque de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement des*

Sciences (ACFAS), présentations libres, section Sciences de la santé, Nutrition et Métabolisme, Université McGill, Montréal, Qc, Canada, 2017 – Présentation orale

Le sulfate de baryum pour le suivi des formulations orales ciblant le côlon. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.A.. *Résumé publié dans : Le 13ième Colloque Biomed*, Université du Québec à Montréal (UQÀM), Montréal, Qc, Canada, 2017 – Présentation par affiche (en annexe)

Barium sulfate as Tracer for *in vivo* Formulation Follow-up and its Impact on Tablet Properties. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.A. *Résumé publié dans : Joint conference of Canadian Society for Pharmaceutical Sciences* (CSPS) *and Canadian Chapter of Controlled Release Society* (CC-CRS)*: De l'innovation à la solution pour le patient*, Présentation no. 101, p.112, Montréal, Qc, Canada, 2017 – Présentation par affiche (en annexe)

Approche alternative à la scintigraphie pour le développement des formulations orales solides. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.A. *Résumé publié dans : La 7ième édition du Colloque Annuel du Réseau Québécois de Recherche sur les Médicaments (RQRM). Le médicament dans un monde vieillisant : de l'innovation à l'usage optimal, Présentation no. 23, p. 27, Québec, Canada, 2017* – Présentation par affiche (en annexe)

Corrélation *in vivo in vitro* pour des formulations orales ciblées à base de carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.A.. *Résumé publié dans : Le 7ième colloque Pharmaqam, présentation no. 13, p.26, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, 201* – Présentation par affiche (en annexe)

6.7 Perspectives

Afin de bien compléter cette étude, il serait intéressant d'évaluer les mêmes formulations mais avec une plus faible concentration en sulfate de baryum. Si le suivi est aussi facile, cela permettra de mettre plus d'actif ou de diminuer la taille du comprimé. Il serait aussi intéressant de voir le comportement du CHI dans le même sujet, évaluer des CHI aux propriétés différentes (degré de déacétylation, poids moléculaire, poudre ou granulé) et voir l'interaction par spetroscopie RAMAN entre le SB et différents CHI. De plus, peu d'information fut trouvée sur la compression du CHI étudiée par RAMAN. Pendant les études de désintégrations, le comprimé de CHI,

CMS et BS s'est dissout après exposition aux FGS et FIS mais il restait des résidus peu solubles. Peut-être serait-il possible de les étudier par infrarouge. L'impact du DS du CMS sur l'endroit de dissolution *in vivo* serait aussi à étudier.

Dans un autre ordre d'idées, selon les aspects de coût, de diagnostic et d'administration, il fut proposé qu'un comprimé de sulfate de baryum serait plus avantageux pour le diagnostic des MICIs et que la méthode de rayons X avec le sulfate de baryum en étant plus accessible pour le suivi d'une formulation à libération ciblée pour le traitement des MICIs. Le comprimé pourrait être conçu de manière à passer l'estomac et se désintégrer dans le côlon pour y larguer une enzyme. Une formulation à livraison locale d'enzymes par érosion (sans diffusion), contenant le sulfate de baryum sous forme de comprimé monolithique avec CMS offrirait la protection gastrique et se dissoudrait dans l'intestin permettant de suivre le relâchement de l'actif (par érosion) par corrélation avec le positionnement du SB.

Des comprimés de sulfate de baryum – Un projet proposé possible consisterait à préparer des comprimés de sulfate de baryum pour suivre une livraison ciblée dans l'intestin ou dans le côlon pour le diagnostic des MICIs affectant des segments du tractus intestinal. La pertinence de ce projet repose sur 3 aspects : diagnostic, coût et aisance pour le patient.

Le volume de suspension visqueuse à boire peut aller jusqu'à 4L d'électrolytes pour le lavage des intestins et 1L de suspension de SB. Les différentes tâches à accomplir pour effectuer un double-contraste (administration de deux produits), l'entéroclyse (administration par une sonde pour gonfler les intestins et distancer les parrois intestinales) et la sensation désagréable dans l'intestin sont de multiples désavantages aux suspensions de SB. Il y a aussi des rares cas de complications associés , par exemple un décès par reflux dans les poumon (Zhang, L. *et al.*, 2015). D'autres

statistiques rapportent 0.03% d'accidents, dont 24 perforations dont 2 morts (Vora et Chapman, 2004).

Un autre agent de contraste comme l'iode lié à des molécules organiques est dispendieux, complexe à utiliser et davantage biodisponible (il pourrait par exemple s'accumuler dans les reins) tandis que le SB est simple à utiliser et son trajet dans le TGI est prévisible.

Le désavantage principal des agents de contrastes pour l'imagerie du TGI est qu'ils requièrent l'administration de grandes quantités pour assurer un bon recouvrement des muqueuses et en même temps de distancer les parois intestinales. Aussi comme c'est liquide, le transit est accéléré, ce qui est contré en augmentant le volume administré (jusqu'à 1L). Lorsque le volume d'agent de contraste devient grand, l'opacité peut devenir trop importante, ce qui diminue la qualité des observations. Il serait donc intéressant de fournir un médium qui est plus solide et dont la vitesse de transit et l'aspect sont différent pour élargir la portée des diagnostics.

Selon ces points, nous proposons un comprimé de SB formulé avec des excipients sélectionnés, qui aura un transit moins rapide et offrirait en se dissolvant une meilleure adhésion mucosale du SB. De cette manière l'observation des replis de muqueuse et des textures pourrait être possible sans distancement des parrois intestinales. Il pourrait même être administré avec un repas, s'incorporer au contenu intestinal et éviter le lavage des intestins en offrant un distancement des parois intestinales (ce qui évite l'entéroclyse). Il pourrait suffire d'administrer plusieurs comprimés (*i.e.* un comprimé toutes les 5 minutes) avec un petit verre d'eau, avant pendant ou après un repas.

Le comprimé sera conçu de façon à se désintégrer dans le côlon et à adhérer aux muqueuses. Le CMS et les HPMC de basses viscosités se sont bien dissouts *in vitro*, contrairement au CMC qui avait un aspect granulaire. L'incorporation du SB dans un comprimé contenant un ingrédient actif pourrait permettre d'observer l'intestin, donc l'efficacité du traitement et de positionner physiquement les points d'inflammation

dans les maladies inflammatoires intestinales. La littérature ne rapporte pas d'imagerie du système digestif utilisant le SB en comprimé. Cela signifie qu'il n'y a pas de concept de base sur le comportement d'un comprimé de SB dans le TGI, ce qui appuie la pertinence d'un tel projet.

En conclusion, les avancées de ce projet pourrait diminuer la dose de SB administrée aux patients. Elles permettraient aussi d'améliorer l'aisance pour le patient : a) lui éviter de boire 1L de suspension de SB ou 4L d'électrolytes pour nettoyer l'intestin; b) utilisation de rayons X normaux au lieu de la tomographie; c) l'administration est plus simple que les techniques de double contraste et entéroclyse. Il serait aussi possible de suivre la libération d'un agent actif et aider à évaluer l'efficacité d'un traitement, ou développer une procédure pour évaluer l'état de l'intestin (observer les épaississements, granulosité, inflammations à l'aide d'un comprimé de SB). Dans tous les cas, l'utilisation du SB comme agent opacifiant offrerait une alternative à la scintigraphie et un diagnostic à moindre coût.

Réalisation du projet - Une livraison ciblée peut être obtenue de plusieurs manières comme l'utilisation d'un enrobage entérique, d'excipients spécifiques ou la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique par l'α-amylase pancréatique, présente en grande quantité dans les fluides intestinaux. Nous avons pensé à faire un comprimé monolithique par compaction directe comme décrit dans la publication du Dr. C. Calinescu (Calinescu *et al.*, 2005) pour obtenir une matrice qui résisterait à l'acidité gastrique et se désintégrerait dans les intestins par changement de pH et activité enzymatique avec l'α-amylase pancréatique. Cette matrice contiendrait les excipients choisis, l'ingrédient actif et le SB. Elle sera testée *in vitro* (désintégration USP). Les analyses *in vitro* sont représentatives du changement de pH durant le transit et le test de désintégration simule bien les mouvements mécaniques du corps.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La livraison ciblée est un moyen de concentrer la médication dans un endroit souhaité du corps. L'utilisation d'un excipient fonctionnel relativement nouveau, le CMA, permet de former des matrices par compression directe des poudres et de concevoir facilement des formulations à libération ciblée à l'intestin. Ces matrices peuvent incorporer des molécules biologiquement actives et rendre le comprimé gastro-résistant sans l'utilisation d'un enrobage et mais soluble au pH intestinal et dégradable par l'α-amylase.

La pharmacopée propose des modèles de simulation du transit gastro-intestinal qui sont dans l'ensemble bien reproductibles entre laboratoires. La corrélation *in vitro-in vivo* dépend beaucoup du modèle choisi et de la nature du composé actif (le médicament). Sachant que des différences dans le transit du TGI peuvent exister entre les individus d'une même espèce et surtout entre les différentes espèces, il était pertinent de comparer les analyses en laboratoire avec des résultats chez un modèle animal.

Le suivi des formulations orales est souvent effectué par rayons X en incorporant le sulfate de baryum. Afin de suivre un comprimé administré, l'influence de l'incorporation du SB fut étudiée et a montré que le SB peut augmenter ou diminuer les temps de désintégration selon la nature de la matrice. La dureté des comprimés est augmentée pour de faibles concentrations mais diminue par après. La spectroscopie infrarouge a permis d'observer qu'aucune modification ne survenait après la compression pour le CMA, la CMC et la HPMC, ce qui n'était pas le cas du CHI, où l'amine semble interagir avec le SB. Les excipients ont aussi été observés purs, avant

et après compression, ce qui changeait l'intensité des bandes mais ne montrait pas de déplacement, même pour CHI.

Dans le but d'assurer une bonne visibilité, l'opacité des comprimés fut étudiée *in vitro* par rayons X. Elle était optimale pour une concentration de SB de 40% et les comprimés plus épais étaient plus opaques. Une hypothèse était que le SB pourrait diffuser hors du comprimé et diminuer l'opacité. L'analyse des comprimés après le passage dans les fluides gastro-intestinaux simulés par microscopie à balayage a montré que le SB restait dans la matrice. Les radiographies prises *in vivo* ont aussi montré que le SB ne présentait pas de trainée derrière les comprimés sauf au moment de la désintégration.

Pour faire un essai d'administration et de suivi par rayon X préliminaire, un comprimé résistant pendant tout le transit fut formulé avec 40% de SB, la quantité optimale déterminée. La HPMC fut sélectionnée comme type d'excipient pour former la matrice du comprimé. Il existe plusieurs grades et tous avaient montré des temps de dissolution de plus de 8h avec et sans SB. Le grade le plus visqueux, K100M, fut choisi car il se désintégrait plus lentement et les comprimés de HPMC type K étaient plus durs que les types E testés. Un comprimé de HPMC K100M avec 40% SB ayant un temps de désintégration de plus de 8h *in vitro* fut alors administré au model chien et les radiographies ont montré qu'il était encore intact au moment du transit dans le côlon (8h). L'administration d'un comprimé à matrice neutre avec le SB a montré une bonne corrélation *in vitro-in vivo*.

L'utilisation du CMA devrait permettre d'obtenir un comprimé qui résiste à l'acidité gastrique mais qui se dissout au pH intestinal et se dégrade sous l'effet de l'α-amylase pancréatique tout en permettant le transport de différentes molécules. Pour étudier l'impact de la présence de contenu biologique, l'albumine de sérum bovin (ASB) fut utilisé comme modèle. *In vitro*, l'ASB ne change pas beaucoup le temps de désintégration mais le comprimé gonfle moins. Alors, une formulation contenant

l'ASB et le CMA et ciblant les intestins fut administrée et le temps de désintégration était plus rapide *in vivo*. Il est probable que le pH gastrique du chien ait varié ou qu'il soit plus haut que celui de l'humain et donc du modèle de simulation de la pharmacopée. Cela aurait pu augmenter la solubilité de la CMC, du CMA et des protéines.

Les comprimés à base de CMA administrés en dupliquas ont montré une variabilité dans le temps de désintégration. Le premier concordait avec le temps obtenu *in vitro* mais l'autre s'est désintégré plus tôt. Les dupliquas à base de CMC ont tous les deux donné le même temps *in vivo* mais ce sont désintégrés plus tôt que lors de la simulation. Davantage d'administrations seraient requises pour valider la justesse des résultats, mais il est certain qu'ils furent influencés par le pH gastrique du modèle animal. Cela peut être dû à un pH gastrique moins acide ou à un temps de résidence dans l'estomac plus court que 2h. Sur les radiographies, le comprimé contenant la CMC semblait d'ailleurs déjà s'éroder dans l'estomac, ce qui pourrait indiquer que le pH était plus neutre et que la CMC est plus sensible au changement de pH. Les radiographies montrent aussi que dans tous les cas, les comprimés semblent avoir déjà quitté l'estomac vers 1h et 1h15 après l'administration. Il se pourrait aussi que la modification des heures de repas du chien ou son état de jeun aient pu influencer les temps de vidages de l'estomac. Pour clarifier ce point, des radiographies plus fréquentes devront être prises lors des prochaines administrations pour bien déterminer le temps de résidence dans l'estomac, d'autant plus que ce point est important pour une formulation gastro-résistante. Les analyses *in vitro* pourraient être ajustées pour représenter le modèle utilisé mais s'éloigneraient des résultats espérés pour le transit dans le TGI de l'humain.

Afin de vérifier la solubilité des formulations à un pH moins bas, le test de désintégration USP fut effectué à différent pH et toutes les formulations se désintègraient deux fois plus vite à pH 5.1 et presque trois fois plus vite à pH 6.8. La protection gastrique est donc moins efficace lorsque le pH est moins acide. Pour la

même formulation, le SB a été remplacé par la CMC et le comprimé s'est désintégré encore plus rapidement que *in vitro*, ce qui montre que la solubilité de la CMC varie en fonction de l'acidité. Le CMA, avec un degré de substitution (DS) faible, est moins ionique que la CMC forme plus de liaisons hydrogène. Les matrices de CMA sont donc moins affectées par une variation de pH.

Pour voir l'impact sur la solubilité, l'ASB a été remplacé par la catalase. La catalase a un poids moléculaire plus élevé, ce qui semble contribuer à son insolubilité. Toutefois, lorsque le pH passe de 1.2 à 3.9, le temps de désintgration passe de plus de 6h à 3h15, ce qui indique que le pH impacte davantage certaines protéines.

Le sulfate de baryum (SB) permet donc de bien suivre les comprimés *in vivo* et leur opacité était suffisante pour les trouver facilement sur les radiographies. Le TGI du modèle de chien se rapproche de celui de l'humain et il est donc possible d'utiliser les comprimés de même format.

La nouveauté de cette étude se situe dans l'observation de l'impact de l'incorporation du SB sur différentes matrices et de son utilisation pour le suivi *in vivo* des comprimés monolithiques sans enrobage, ciblant l'intestin et à base de carboxyméthylamidon, un nouvel excipient. Nous proposons aussi la corrélation entre les temps de désintégration *in vivo-in vitro* pour un contenu destiné à agir dans l'intestin, plutôt qu'entre les cinétiques d'absorption pour les petites molécules.

ANNEXE A

A.1 : Tableau synthétiques présentant les références sur l'imagerie des formulation pharmaceutique de la section 3.4.4

Tableau A.1 : Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi des formulations orales par rayons X

Tableau A.2 : Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi des formulations orales par scintigraphie

A.2 – Contribution comme coauteur à la rédaction d'un article de revue

Self-Assembling Phenomena : From Excipients to Drugs. Ispas-Szabo, P., Labelle, M.-A., Mateescu, M.-A. *Publié dans: Journal of Biochemistry and Chemical Sciences (NorCal Open Access Publications)*, Vol 2017 1:28-36.

A.3 – Résumés publié des communications orales

1 - Study of barium sulfate tablets as possible tracers in inflammatory bowel diseases. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.-A. *The 19th Concordia Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference* (CBGRC), section *Computational and physical chemistry*, Montréal, Qc, Canada, 2016.

2 - Des comprimés de sulfate de baryum pour le diagnostic des dysfonctions intestinales. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M. *Le 85ième Colloque de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences (ACFAS), présentations libres, section sciences de la santé, Nutrition et Métabolisme*, Université McGill, Montréal, Qc, Canada, 2017.

A.4 - Résumés publiés avec présentation par affiche

Figure A.1- Le sulfate de baryum pour le suivi des formulations orales ciblant le côlon. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.-A.. *Résumé publié dans : Le 13ième Colloque Biomed*, Université du Québec à Montréal (UQÀM), Montréal, Qc, Canada, 2017.

Figure A.2 - Barium sulfate as Tracer for *in vivo* Formulation Follow-up and its Impact on Tablet Properties. Labelle, M.-A., Ispas-Szabo, P., Masseau, I., Chorfi, Y., Mateescu, M.-A. *Résumé publié dans : Joint conference of Canadian Society for Pharmaceutical Sciences* (CSPS) *and Canadian Chapter of Controlled Release Society* (CC-CRS)*: De l'innovation à la solution pour le patient*, Présentation no. 101, p.112, Montréal, Qc, Canada, 2017.

Figure A.3 - Approche alternative à la scintigraphie pour le développement des formulations orales solides. Labelle, M.-A., Chorfi, Y., Masseau, I., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.-A. *Résumé publié dans : La 7ième édition du Colloque Annuel du Réseau Québécois de Recherche sur les Médicaments (RQRM). Le médicament dans un monde vieillisant : de l'innovation à l'usage optimal,* Présentation no. 23, p. 27, Québec, Canada, 2017.

Figure A.4 - Corrélation in vivo in vitro pour des formulation orales ciblées à base de carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose. Labelle, M.-A., Chorfi, Y., Masseau, I., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.-A. ***Résumé publié dans : Le 7ième colloque Pharmaqam,*** présentation no. 13, p.26, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

A.1 Tableaux synthétiques présentant les références sur l'imagerie des formulations pharmaceutiques de la section 3.4.4

Tableau A.1 Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi des formulations orales par rayons X. Les publications répertoriés sont celles accessibles et ayant des radiographies incluses.

RX modèle	Formulation	Cible	Temps Désin. Ou Libér.	Charge en Sulfate de Baryum	Agent Actif	Informations supplémentaires	Référence
H	CD + ECD	Côlon	2-4h	66% n	*Triphala*	HPMC	(Momin et Pundarikakshudu, 2005)
H+Cn	Gel + capsule	Estomac	0h	Inconnue	Riboflavine	Gâteries	(Ahmed et Ayres, 2007)
H	CD + GS	Côlon	1-3h	15%	Mésalazine	ALG	(Tugcu-Demiroz *et al.*, 2007)
H	Film (oral)	Œsophage	0h	Inconnue	Glimépiride	PVA	(Okabe *et al.*, 2008)
L	GH, MA	Estomac	1h (LP)	13%	Théophylline	CHI HPMC	(Senthil *et al.*, 2010)
Rat	Capsule	Modulable	0h (LP)	10 mg	Général	Éponde d'amidon	(Shibata *et al.*, 2010)
Chat	Commerciale	Générale	-	Inconnue	-	-	(Bennett *et al.*, 2010)
Rat	Capsule, ES	Générale	- (ND)	100% n	-	Eudragit	(Saphier *et al.*, 2010)
Ch	ECD	Colon	>6h	33%	5-Fluouracil	Enrobage CHI	(Yassin *et al.*, 2010)
H	Flottante	Estomac	0h (LC)	14%	Ciprofloxacine	HPMC ALG MA	(Tadros, 2010)
L	GH, CD, ES	Côlon	3h (AM)	17% n	5-Fluorouracile	Pectine:amidon	(Dev *et al.*, 2011)
H	GH, ES	Côlon	5h (DR)	25% n	Diclofénac	SSG, Eudragit	(Kshirsagar *et al.*, 2011)
L	CD, ES	Colon	5h	<50% n	Théophylline	Eudragit	(Patel, Mayur M. et Amin, Avani F., 2011)
L	CD, MS, ES	Colon	5h	<40% n	Mébévérine	Eudragit	(Patel, M. M. et Amin, A. F., 2011)
L	GH	Colon	7h	<5%	Méloxicam	Eudragit MS	(Srivastava *et al.*, 2012)
L	BF, ES	Estomac	0h	30% n	Ofloxacine	Extrusion	(Zhang, C. *et al.*, 2012)
Cn	BF	Estomac	0h	Faible	Furosémide	CHI réticulé	(ElMeshad et El-Ashmoony, 2012)
L	MS, MA	TGI	0h	20-30%	Cefpodoxime p.	CHI émulsion	(Nappinnai et Sivaneswari, 2013)
L	GH, ECD	Côlon	6h	66% n	Budésonide	Gommes	(Pachuau et Mazumder, 2013)
H	CD, flottante	Estomac	0h	50% n	Céfuroxime a.	$NaHCO_3$/HPMC	(Rao *et al.*, 2013)
Rat	GH, ES	Côlon	0h	5 mg	Mésalazine	CHI:EDTA	(Singh *et al.*, 2013)
L	MS	Générale	0h	15%	5-Fluorouracil	ALG-CHI PEC	(Pendekal et Tegginamat, 2013)
L	MS flottante	Estomac	0h	15-50%	Famotidine	Eudragit	(Gupta *et al.*, 2014)
H	Capsule	Estomac	0h	21%	Lévofloxacine	HPMC K100M	(El-Zahaby *et al.*, 2014)
L	MS, Capsule	Générale	0h	2-4%	*Psyllium*	ALG réticulé	(Sharma, V. K. et Mazumder, 2014)
Rat	CD	Estomac	0h	10%	Métronidazole	ALG	(Dios *et al.*, 2015)
S	Enema	Rectum	-	-	Mésalazine	-	(Sinha *et al.*, 2015)
Rat	MS, ES	Intestins	7h	60%	*S. Calcitonin*	Eudragit	(Aguirre *et al.*, 2016)
L	CD, MA	Estomac	0h	Inconnue	Simvastatine	MA cystéine	(Bhalekar *et al.*, 2016)
L+S	Solution de MS	Estomac	0h	15-50% n	Rabéprazole	Eudragit	(Choudhary *et al.*, 2016)
L	Solution de BF	Estomac	0h	Faible	Amoxicilline	HPMC-ALG	(Dey, S. K. *et al.*, 2016)
L	Granules EH	Estomac	0h	30% n	Ofloxacine	Multi-couches	(Zhang, C. *et al.*, 2016)
Rat	LC, CD	Intestins	0h	Inconnue	Acétamin.	Electro-Spin.	(Hamori *et al.*, 2016)
L	MA	Générale	0h (LP)	Inconnue	Albendazole	Dend + CHI	(Mansuri *et al.*, 2016)
Cn	CD, ECD	Côlon	>6-8h	80% n	Métronidazole	Pectine+HPMC	(Tung *et al.*, 2016)

H : Humain
L : Lapin
S : Souris
Cn : Chien

CD : Compression Directe
GS : Granulation à Sec
GH : Granulation Humide
MA : Muco-Adhésive
MS : Micro-Sphères
ECD : Enrobage par CD
ES : Enrobage par une Solution (En solution ou vaporisation)
BF : Billes flottantes

n : Noyau
LC : Libération Contrôlée
LP : Libération Prolongée
ND : Non-Désintégrante
DR : Désintégration Rapide
AM : Activation Microbienne

Dend : dendrimère
PEC : Complexe poly-électrolyte
SSG : Glycolate sodique d'amidon
ALG : Alginate

Tableau A.2 Analyse thématique des principales publications de la littérature pour le suivi de formulations orales par scintigraphie.

Modèle	Formulation	Cible	Agent actif	Référence
Inconnu	Enrobage	Intestins	Inconnu	(Parr *et al.*, 1986)
Humain	Enrobage	Œsophage	Risédronate	(Perkins, A. C. *et al.*, 1999)
Humain	Enrobage	Œsophage	Risédronate	(Perkins, Alan C. *et al.*, 2001)
Humain	Enrobage	Côlon	Aucun	(Goto *et al.*, 2004)
Humain	Chitosan MA	Intestins	Aucun	(Sakkinen *et al.*, 2006)
Lapin	Flottante	Estomac	Metformine	(Ali *et al.*, 2007)
Chien	Enrobage par CD	ChronoDeliv.	Théophylline	(Ghimire *et al.*, 2007)
Lapin	MA MS	Côlon	Diloxanide F.	(Anande *et al.*, 2008)
Humain	Désintégration rapide	Œsophage	Risédronate	(Perkins, A. C. *et al.*, 2008)
Chien-H	Enrobage par CD	Estomac	Vérapamil	(Zou *et al.*, 2008)
Humain	Enrobage pectine	Côlon	Aucun	(Hodges *et al.*, 2009)
Humain	Générale	Intestins	Géfitinib	(Wilson *et al.*, 2009)
Humain	Érosion par HPMC	Générale	Aucun	(Ghimire *et al.*, 2010)
Humain	Comprimé magnétique	Générale	Aucun	(Goodman *et al.*, 2010)
Chien	Comprimé	Estomac	Famotidine	(Guan *et al.*, 2010)
Souris	Enrobage	Côlon	Oxaliplatine	(Jain *et al.*, 2010)
Humain	Enrobage	Intestin grêle	Aucun	(Liu, F. et Basit, 2010)
Humain	Capsule	Intestins	Lévétiracétam	(Stockis *et al.*, 2010)
Chien	Enrobage pectine	Côlon	Acétaminophène	(Ahmed et Ayres, 2011)
Humain	Compression directe	Générale	Hydrophobe	(Ghimire *et al.*, 2011)
Humain	Muco-adésive	Estomac	Rifampicine	(Pund *et al.*, 2011)
Humain	Reproduc. of oral admn.	Générale	Aucun	(Yeong *et al.*, 2011)
Lapin	Libération contrôlée	Estomac	Rivastigmine	(Kapil *et al.*, 2012)
Humain	Flottante	Estomac	Riboflavine	(Yao *et al.*, 2012)
Humain	Comprimé multi-couches	TGI	Tamsulosine	(Hodges *et al.*, 2013)
Humain	Enrobage	Iléo-Côlon	Prednisolone	(Varum *et al.*, 2013)
Humain	Libération rapide	TGI	Kétoprofène	(Vueba *et al.*, 2013)
Lapin	Flottante	Estomac	Aténolol	(Dey, S. *et al.*, 2014)
Humain	Rétention gastrique	Estomac	Pranlukast	(Sugihara *et al.*, 2014)
Humain	Capsule	Intestinal	Tacrolimus	(Tsunashima *et al.*, 2014)
Rat	Suspension MA	Estomac	Propanolol	(Yuan *et al.*, 2014)
Humain	Non-désintégrant	Intestins	Inconnu	(Pislar *et al.*, 2015)
Humain	Capsule	LC, Côlon	Ziprasidone	(Thombre *et al.*, 2015)
Humain	Flottante	Estomac	Ascaridole	(Zhao *et al.*, 2015)
Humain	Enrobage	Côlon	Théophylline	(Celkan *et al.*, 2016)
H+Lapin	Activation microbienne	Côlon	Tinidazole	(Sharma, B. G. *et al.*, 2016)
In vitro	Modèle de côlon	Côlon	Théophylline	(Stamatopoulos *et al.*, 2016)

CD : Compression Directe
GH : Granulation Humide
H : Humain
MA : Muco-Adhésive
MS : Micro-Sphères
LC : Libération contrôlée

A.2 Participation comme coauteur d'un article de revue

NorCal Open Access Publications
Journal of Biochemistry and Chemical Sciences
Volume 2017; Issue 01
Ispas-Szabo P et al.

Review Article

Self-Assembling Phenomena: From Excipients to Drugs

Pompilia Ispas-Szabo*, Marc-André Labelle and Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Branch Centre-Ville, Montreal (QC) Canada

***Corresponding author:** Pompilia Ispas-Szabo, Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, PO 8888, Branch Centre-Ville, Montreal (QC) H3C3P8, Canada, Tel: +1 5149873000/0318; Fax: +1 514 9874054; E-mail: ispas-szabo.pompilia@uqam.ca

Received Date: 05 October, 2017; **Accepted Date:** 09 November, 2017; **Published Date:** 28 November, 2017

Abstract

The universality of self-assembly can be illustrated by an extensive range of examples found in all categories of materials present in Nature. Inspired by its principles, multiple scientists have synthesized new self-assembled materials, many of them having pharmaceutical and biomedical applications. This review tries to bring some significant insights related to how minor modifications at molecular level are translated, via self-assembling phenomena, in major macroscopic changes expanding the range of practical applications. Based on the principle of weak forces interactions which didn't involve chemical modifications, self-assembly is an interdisciplinary approach able to generate complex aggregates, some of them comparable to living structures. The advantages of self-assembly consist in generation of organized systems that cannot be made by other procedures and in understanding the phenomena occurring in living organisms. Various examples of self-assembly phenomena were given for starch and its derivatives with the aim to illustrate how the same chemical entity can generate by minor modifications an extensive range of new compounds with divers features. Based on the principle of weak interactions between building blocks, the self-assembly proved its benefits in preparation of more efficient drug delivery systems and anti-cancer treatments. The review also includes some methods that can be used for characterization of self-assembled compounds discussed. More recently, the approaches based on supramolecular self-assembly processes are also used for fabrication of nanometer-scale objects, one of the major fields of research for the current technology.

Keywords

Drug-Drug Interactions; Excipients; Hydrogels; Polyelectrolyte Complex; Polymers; Self-Assembly; Starch Derivatives

General Considerations

Self-assembly of various types of molecules in complex supramolecular structures represents an extensively explored avenue in the development of new entities useful for applications including drug delivery systems, more efficient drugs or diagnostic agents. Furthermore, the fabrication of nanometer-scale objects is one of the major challenges in current technology and several disadvantages including size-restrictions can be solved only by alternative approaches based on supramolecular self-assembly processes. The universality of the self-organized structures is proven by examples found in all categories of materials unifying polymers, proteins, lipids or inorganic molecules which are already present in living organisms or were synthesized. Based on the principle of weak forces interactions which didn't involve chemical modifications, self-assembly transcends the traditional divisional borders of science offering a highly interdisciplinary approach able to generate complex aggregates some of them comparable to living structures. The advantages of self-assembly consist in generation of structures that cannot be made by other procedures and in understanding the phenomena of life [1].

Focused on a wide range of discrete molecules or molecular assemblies (considered as building blocks) and involving physical transformations, the molecular self-assembly is a process by which noncovalent, weak interactions formed between the molecules drive their assembly and organization, affording supramolecular structures that define the final features of the material. In addition to the advantages offered by traditional materials, self-assembled materials provide versatility and functionality for a full range of applications (i.e.,theranostics) by their capacity to be tailored, sometimes at monomer level, with specific properties that suit an intended application [2]. If initially self-assembly was used to develop products as microspheres, micelles and

liposomes based on polymers and lipids, in the last two decades more sophisticated structures appeared proposing nanogels, cubosomes, nanofibers, polyelectrolyte capsules, quantum dots [3], nanocrystals, supramolecular inclusion complexes [4].

The driving forces of the self-assembly are weak physical interactions including hydrophobic associations, hydrogen bonding, electrostatic interactions and van der Waals forces. They are occurring in wet phase and the self-assembly either must be reversible or must allow the components to adjust their positions within an aggregate once it was formed. Therefore, the strength of the bonds between the components must be comparable to the forces tending to disrupt them [5]. Without the intervention of external forces, the process must lead to a lower Gibbs energy, to more thermodynamically stable self-organized structures compared with individual ones.

From the huge variety of possible self-organized structures this review tries to bring some significant insights related to how minor modifications at molecular level are translated, via self-assembling phenomena, in major macroscopic changes expanding the range of practical applications. From ever-increasing number and diversity of applications only part of them will be discussed as examples. The versatility of self-assembling concept will be illustrated in polymeric systems which generated new excipients and in new drug molecules for pharmaceutical or biomedical applications. This review could be considered as a source for pharmaceutical scientists wishing to explore the concept of self-assembling and find practical and elegant solutions to create new structures.

Key Points

Molecular self-assembly is characterized by:

- Non-covalent interactions
- Spontaneity
- Increased thermodynamic stability
- Building blocks
- Order
- Reversibility
- Nano and micro-size

How Self-Assembly Works?

Despite the huge variety of generated structures, two common characteristics are involved in the self-assembly of systems a) hydrophilicity/hydrophobicity or b) ionic charges present on each specie. These two parameters would influence the geometry of the respective systems inducing complementarity in shapes among the self-assembling components which is a crucial aspect [6]. Geometry seems very important for circulatory persistence of anticancer drug (paclitaxel) and cellular uptake. Shuvaev et al., [7] showed that filomicelles (obtained from amphiphilic block copolymers self-assembled into worm-like micelles) can effectively deliver the paclitaxel and shrink human-derived tumors in mice being long circulating vehicles. It was found that filomicelles persisted in the circulation up to one week - about ten times longer than their spherical counterparts [8]. This aspect may give some insights into possible impact of filamentous shape of natural viruses.

Most of self-assembled molecules are amphiphilic containing hydrophobic and hydrophilic domains where the hydrophilic part can carry charges (anionic, cationic or zwitterionic) or be polar but uncharged. The presence and distribution of hydrophilic and hydrophobic characteristics in a molecule is directly related to its chemical composition. Considering general categories of substances i.e., polysaccharides, lipids and peptides there is evident that the interplay of hydrophilicity/hydrophobicity and presence of ionic charges will impact a full range of properties as packing between themselves or external interactions [9,10]. Intramolecular interactions are responsible for the conformation of the molecule conducting to a specific secondary structure (helix, coil, sheet) while the intermolecular non-covalent interactions are responsible of self-assembled macromolecular structures (i.e., micelles, vesicular tubes, lamellar sheets).Figure 1 is illustrative for the self-assembling to limited category of substances and the impact of the distribution of hydrophilic and hydrophobic segments [11].

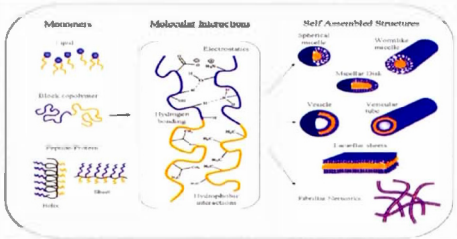


Figure 1: Illustration of self-assembly established by hydrophobic associations and polar interactions.Blue - hydrophilic portions; Orange - hydrophobic regions [11].

In lipids the amphiphilicity is distributed along the length of the molecule. Similar repartition along the molecule length can be found in synthetic block copolymers containing distinct blocks of hydrophilic and hydrophobic polymers [11,12]. In peptide and proteins, the repartition of amphiphilicity is different (Figure 1), allowing an alternation of hydrophilic and hydrophobic features in one face or another of the helix or β-sheet conformation [13]. The stabilization of systems via intra- or inter-chain self-assembling is a common characteristic of polysaccharides and proteins: α-helix and the β-sheet secondary structures in proteins ensure an overall globular subunit while the helical and ribbon-like structures of polysaccharides help them to perform their natural roles in maintaining the hydration and integrity of biological tissues [14].

The folding-unfolding of hydrophobic polymers in water was investigated in order to get some insights of the hydrophobic interactions in the context of realistic self-assembly processes. Hydrophobic polymers are interfacially active preferring locations at aqueous interfaces relative to bulk water, consistent with their low solubility. Molecular dynamics simulations showed that at the solid-water interface, polymer conformations are quasi-bidimensional, with folded states pancake-like structures. Some similarities between thermodynamics of polymer collapse and of protein folding, showed the role of hydration and fluctuations in the folding kinetics [15].

Other important aspects on self-organization phenomena are the contribution of interfacial energy when particles (nanoparticles) interact only weakly at flat interfaces and will assembly into more robust arrangements [16]and the interactions of biopolymers with the solvent. These are specific and nonspecific interactions occurring in an aqueous media must always consider the polar Acid-Base (AB) interactions representing about 90% of all the non-covalent interactions: in water, they can be attractive or repulsive. Together with AB interactions, the classical theory of non-covalent short-to long-range macroscopic-scale interactions between apolar and/or polar surfaces immersed in a liquid takes into consideration also apolar Lifshitz-van der Waals (LW) attraction and Electrical Double Layer (EL) repulsion. Whilst both AB and EL forces decay exponentially as a function of distance, LW interactions, for the LW interactions, decay quite gradually, i.e., proportionally to the distance [17].

Irrespective if the polysaccharidic chains are linear (i.e., pullulan) or branched (i.e., scleroglucan, xyloglucan) neutral or ionic, their self-association will be highly dependent on steric conditions issued from chain-chain and chain-solvent interactions [18]. As in all polymer systems, there is an entropic drive to the disordered (random coil) state which must be balanced by sufficiently favourable non-established interactions before a new ordered form can be adopted [19]. In case of polysaccharides, the alignment and interaction of two or more chain segments, usually with long regions of regular covalent sequence, will conduct to secondary structures and supramolecular associations. Using the same concepts of stabilization via weak but extensive and cooperative forces (i.e., hydrogen bonding, ionic interactions) various dosage forms based on polysaccharides, polysaccharides derivatives or polysaccharides and proteins were prepared in previous decades and successfully used to control the drug release [20-22].

Key Points

Features that can influence self-assembly:

- Hydrophilic/hydrophobic ratio
- Interfacial free energy
- Presence of ionic charge
- Specific interactions
- Interaction with solvent
- Complementarity in shapes

Self-Assembly in Polysaccharides

Carbohydrates like starch and cellulose, having the chemical composition based on similar repetitive glucose units, exhibit totally different properties due to the alpha or beta position of the linkage between the glucose block units. With alpha 1-4 orientation starch adopts helical conformations such as V- type single or A-, B-double helix which are packed in circular grains, whereas cellulose, having beta 1-4 links, has a stiff rod-like conformation. In both cases, the self-assembly occurs via hydrogen bonds established between the multiple hydroxyl groups present on the glucosidic chains. In case of cellulose,inter- or intra- chain hydrogen bonds hold the chains firmly together side-by-side conducting to microfibrils with high tensile strength [23].

In starch, various conformations will be translated in different morphologies and consequently in various behaviors of the material [24]. The polyglucosidic chains could be stabilized either in single helix which exhibit a hydrophilic surface and a hydrophobic inner channel or by alternation of hydrophilic and hydrophobic segments in double helices (Figure 2). Furthermore, not only physical but chemical modifications may induce the conversion of B to V-type helices. Such conversion was found by starch cross-linking and carboxylation and will be discussed in the next section.

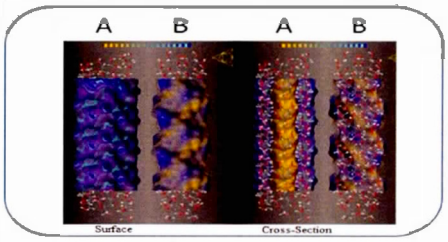


Figure 1: Molecular lipophilic patterns for starch single helix V-type (A) and double helices (B).

For both the left represents the surface; the right is the cross-section. The outside surface area of V-type amylose is uniformly hydrophilic (blue color) whereas the center channel is as distinctly hydrophobic (yellow) and able to incorporate equally hydrophobic guests such as iodine or fatty acids. By contrast, the double-helical form of amylose, devoid of a center channel, exhibits an irregular distribution of hydrophilic and hydrophobic regions over the entire surface [25].

The presence of these helical forms and their level of organization in starch composition is the key element for its functionality. If in dry grains the polyglucosidic chains are packed very tiddly, in wet phase and at light heating (50°C) this compact organization is disrupted and helical forms are disorganized, chains adopting a random coil conformation (gelatinization). The process is the result of novel hydrogen bond interactions established between starch chains and water molecules. During

Citation: Ispas-Szabo P, Labelle M-A, Mateescu MA (2017) Self-Assembling Phenomena: From Excipients to Drugs. J Biochem Chem Sci 2017: 28-36

time, in this metastable preparation, the polyglucosidic chains will self-assembly spontaneously and stabilized themselves in double and single helices.This physical process known as starch gelation consists in creation of an extended and stable polymeric network obtained by simple self-assembling phenomena.

In case of cellulose, a vast number of derivatives are presently used as pharmaceutical excipients. One important category of gel forming materials are obtained by grafting hydroxylic (hydroxypropyl HP) and hydrophobic (methyl M) groups on cellulosic chains. By modulation of hydrophilic/hydrophobic ratio in the obtained derivatives known as HydroxypropylMethyl Cellulose (HPMC) the hydration of polymer can be controlled and implicitly the drug release via mechanisms driven by diffusion and/or erosion. The main element to control the drug release from tablets based on HPMC is related to polymer self-organization (chains entanglement, relaxation) and their capacity to self-assembly in stable polymeric networks called hydrogels [26].

In case of chitosan, which is strongly stabilized by hydrogen bonding associations, the N-acylation with fatty acid chains, changes the type of self-assembling from hydrophilic to hydrophobic stabilization resulting in longer sustained release time of active agents [27].

Same chemistry and different properties due to self-assembly in starch derivatives

There is a vast number of usages in food and pharmaceutical fields related to gel formation and structure as a main element defining the kind of application. The self-assembly of starch polymeric chains is largely used in drug delivery systems to delay, sustain, control or target the drug into gastro-intestinal tract.

Minor chemical modifications (i.e., low differences in crosslinking degree) can greatly impact the capacity of organization under helical forms and offer an additional tool to promote or limit self-assembly phenomena. A low degree of crosslinking will allow a lot of flexibility of polyglucosidic chains which can self-organize as double helices and create a stable gel network able to ensure a controlled drug delivery for up to 20h (Figure 3) [28-32]. As soon as the frequency of crosslinking (transversal bridges between the chains) will be too high this will hinder chains closeness and their stabilization [33].Thus, the polymeric chains will be less flexible and the spontaneous enrollment in double helices will decrease. The structure becomes amorphous and starch loses its matrix-forming capacity. This change will be reflected in a drastic modification of its properties: from a matrix-forming material at low crosslinking it becomes a powerful disintegrant at higher crosslinking. Practically the hydroxyl groups will be easily hydrated favoring a fast disintegration. In both cases the self-assembly involves hydrogen bonding between hydroxyl groups of polyglucosidic chains and water molecules [34]. Starch and water interactions play a crucial role in starch self-organization [20,35,36].

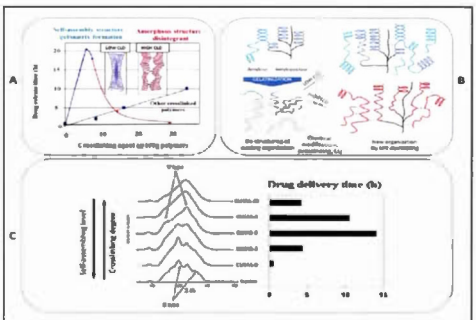


Figure 3: The impact of self-assembly phenomena on starch excipients used in drug delivery.

A) Drug release properties of starch with low (in blue) and high (in red) crosslinking degree (CLD); B) Self-assembly phenomena occurring during starch gelatinization and reorganization following chemical crosslinking; C) X-ray diffractograms associated with the presence of double helices and single helix organization: Increase of Cross-Linking Degree (CLD) avoid self-assembling generating more amorphous structures [29].

The capacity of starch to self-assembly in helical forms distinguishes completely its behavior compared to synthetic polymers where an increase of crosslinking degree generates smaller size of polymeric mesh and consequently a longer release time of drugs (Figure 3A other polymers [37]). In crosslinked starch the variation of drug release time is non-monotonous because only a narrow window (i.e., 3 - 6 g crosslinker/100 g of polymer) of crosslinking allows enough flexibility of chains to adopt spontaneously stable structures (Figures 3A and B). X-ray diffraction technique is an useful tool able to capture organization of polyglucosidic chains as B-double or V-single helix morphological forms and a good structure-properties correlation can be established [31] for such systems (Figure 3C).

More generally, the ratio between order (i.e., presence of helices, sheets, crystals, etc.) and disorder (amorphous structures, individual species, etc.) of a system will be an essential aspect ensuring its stabilization by self-assembly phenomena and a key element to modulate it and obtain specific properties [38].

Ionic charges: Carboxymethyl starch from gastric stability to intestinal chrono-delivery

Based on non-covalent forces, the self-assembling could be reinforced or weaken by the presence of electrostatic charges. Stimuli-responsive hydrogels, including thermo- and pH-sensitivity, are also considered with particular focus on self-assembled structures with pharmaceutical applications. Depending of the type of charge (anionic, cationic) and its location (on the same or different chains) the attractions or repulsions electrostatic forces

will impact conformation of the chains and consequently their geometry, proximity and solubility [39]. In polysaccharides the abundance of hydroxyl groups is responsible for intra and intermolecular H-bond interactions that will conduct to a supramolecular organization [19]. The presence of ionic substituents on the polysaccharidic chains will contribute mainly to the same phenomena: stabilization of helical conformation and gel formation but in these systems the electrostatic forces will also participate in the self-assembling (Figures 4 and 5).

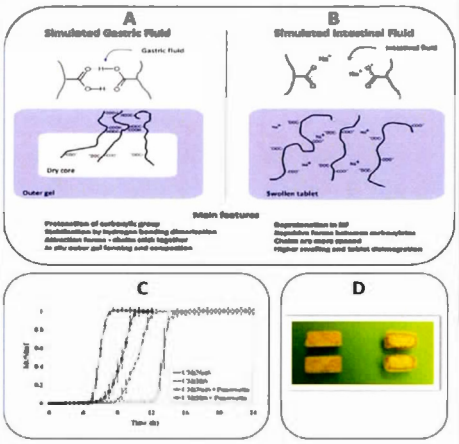


Figure 4: Illustration of self-organization in an ionic starch derivative and in pancrelipase tablets when exposed to simulated gastric and intestinal fluids.

A) CMS in SGF; B) CMS in SIF; C) Diclofenac release profiles obtained from double core CMS tablets; D) cross section of pancrelipase excipient-free tablets exposed for 1 h to SGF [40,41].

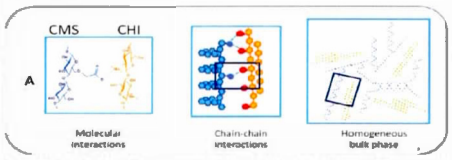


Figure 5A: Schematic presentation of CMS and CHI self-assembly established by electrostatic interactions between anionic carboxylic groups and cationic amino groups.

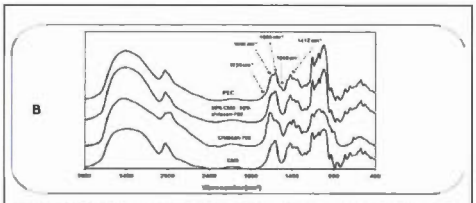


Figure 5B: FTIR spectra of CMS, CHI (80% deacetylated), CMS-CHI (50:50) blend and PEC in KBr disks [42].

We will consider the example of the CarboxyMethylStarch (CMS) to illustrate the impact of the anionic charges on starch functionality. Even at very low degree of substitution (few carboxymethyl CM groups grafted on starch chains (Degree of Substitution DS 0.029) [43] the polymer solubility becomes pH dependent exhibiting low solubility in gastric medium (pH 1.2) but dissolving in the intestine at neutral pH. From pharmaceutical perspective, this dependency was useful for oral dosage forms requiring gastro-protection. CMS have shown excellent features for oral formulation of bacteria [44], vaccines [45], therapeutic enzymes [46,47], etc. The mechanism of gastro-protection offered by CMS in media simulating stomach acidity can be explained by self-assembly of carboxylic groups. In acidic media they are protonated (Figure 4A) and, due to their tendency to create dimers the polymeric chains become very close and stabilize between themselves. These chain-chain interactions via carboxylic groups will generate *in-situ* an outer gel layer which will act as a pH-protecting coating at the surface of the tablet keeping the core untouched by acidity (Figure 4A). In Simulated Intestinal Fluid (SIF) the CM groups will be ionized and their repulsive electrostatic interactions as well as presence of water and salts in the media will favor a rapid hydration of chains and consequently tablet swelling, erosion and disintegration (Figure 4B).

This pH-dependency of CMS associated with its self-assembling capacity was applied to delay the release of some drugs (i.e., sodium diclofenac) for 4h or 8 h and respectively 12 h (Figure 4C) with a chronodelivery patterns [40]. Similar associative phenomena were observed also in proteins which are able to self-stabilize by weak forces when exposed to SGF. Formulation of therapeutic enzymes could be problematic considering that the application of an enteric coating could alter enzyme activity. For such challenging formulations it was found that a very simple process of dry mixing of enzyme powder with a minimum amount of CMS can generate gastro-resistant tablets [41]. The

external layer (brown color - figure 4D) formed at the surface of such tablet obtained by direct compression of pancrelipase with a minimum amount of CMS (less than 10%) is acting like a protective coating able to preserve the enzymatic activity of pancrelipase inside the tablet core (light color).

Polyelectrolyte complexation: CM-Starch and Chitosan intelligent tandem-excipients

Generally, the presence of charges on the polymeric chain implies also counterions and, compared to non-charged polymers, the polyelectrolytes are more soluble in water due to electrostatic repulsions among and along polymeric chains and more sensitive to salts.

The usefulness of self-assembled structures can be illustrated by the preparation of Polyelectrolyte Complexes (PEC) when one of anionic polysaccharides (i.e., carboxymethyl starch, gellan, xanthan, alginate) was used in combination with chitosan [42,48,49]. When synthetic or semi-synthetic polymers are used, depending on preparation method, the distribution of the two polymers could be very different and may generate various types of products from nano fibers [50], beads [48], nano/microparticles [51] to cryogels and multilayer films [52] which can serve to adapt the dosage form to specific requirements [53].

In case of PEC obtained by self-assembling of CMS (carrying anionic COO^- groups) and Chitosan (CHI) (positively charged with NH_3^+ groups) (Figure 5A) it is interesting to note that the processing has a significant impact on properties of PEC. When CMS and CHI were mixed as dry powders and compressed together their blend generated matrices able to control the drug release for up to 6-8h [42,54]. If the same individual polymers, respectively the anionic CMS and cationic CHI are co-processed together, the properties of the obtained complex may be improved in terms of stability and homogeneity. The mixture of the polymers in solution, upon drying, will present particles with size similar to the raw powders but each of them will contain small regions of both polymers. These small regions will allow closer neighboring of the cationic and anionic polymers than in the dry mixture. This will result in formation of stronger gel able to contain various molecules i.e., the liberation of aspirin was extended to more than 24h, compared to 6-8h for the mixed powders [42].

The structural analysis by microscopy have showed that the two components were co-precipitated. FTIR data have showed some chemical interactions between CMS and CHI. When PEC spectrum was compared with those of CMS and CHI blend, equivalent peaks were found, except for the weak shoulders around 1735 cm^{-1} and 1540 cm^{-1} for PEC at pH 5. They could be attributed to -COOH and - NH_3^+ groups and seems to be related to weak interactions established between the two ionic groups (Figure 5B). The amine and amide bands of chitosan are known to shift upon complexation or be influenced by the environment in regards of the type of polymer used for the association [55,56]. Further studies could emphasize the FTIR band shifting in relation to the PEC ratios or with different polymers used in associative compounds.

Self-assembled nanostructures in drug delivery hydrogels, via physical interactions between polymer-polymer and polymer-drug, require accurately controlled macro- or small molecular architecture and a comprehensive knowledge of the physicochemical properties of the therapeutics. A variety of nanostructures within hydrogels provide useful routes to stabilize the encapsulated drug and control its release kinetics such as micelles, layer-by-layer constructs, supramolecular inclusion complexes, polyelectrolyte complexes and crystalline structures [57-59].

Key Points

- Starch is a very versatile polymer able to generate by self-assembly a vast range of excipients useful for pharmaceutical and biomedical applications
- Minor modifications at molecular level will be translated in new self-organized structures and new features of the polymer
- Starch morphology plays a crucial role on its functionality and distinguishes starch from many other excipients

Drug - Drug Self-Assembly

Differently from existing approaches which explore mainly the drug-excipient association in order to improve drug solubility or stability, a new alternative: drug-drug self-assembling - using two different active molecules, was also explored recently [60-64]. Mesalamine (5-aminosalicylic acid, MES) known as a drug for inflammatory bowel disease seems be frequently associated with side effects when administrated orally [65,66]. Sucralfate (SUC) is a non-systemic local protector prescribed in the treatment of gastric ulceration. The anti-inflammatory action of MES in association with bioadhesiveness and mucosal healing properties of SUC were envisaged as a possible treatment of ulcerative colitis. It was found that via self-assembling of the two drug molecules, a new and stable entity can be generated [60].

The structural data (X-Ray, FTIR, SEM, DSC and ^{1}H-NMR) have shown that MES and SUC can interact leading to complexes with properties differing from those of each separate active agent and from their physical blends. ^{1}H-NMR results indicated that complexation occurred in aqueous suspension of mixed drugs, prior to drying suggesting that the drug-drug self-assembling was the driving mechanism in the formation of the new entity. Based on the structural data, a hypothetical structure of the complex was proposed (Figure 6) where ionic interactions

(between amino groups NH_2 and aluminum ions) as well as hydrogen bonds (established between HO- groups of carboxylic function of mesalamine and hydroxyl of the aluminium of sucralfate molecule) will contribute to stabilization of self-assembled entity. It was observed that when the two drug molecules are in aqueous medium a thixotropic paste is formed. Furthermore, *in vitro* dissolution studies monitoring mesalamine release from oral solid dosage forms based on MES-SUC complexes showed a very linear, controlled release [60].

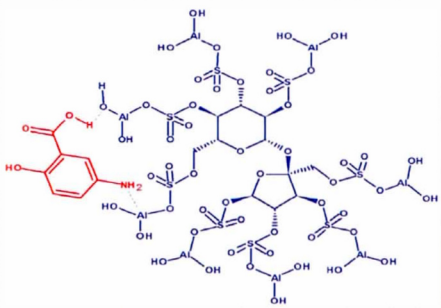


Figure 6: Hypothetical structure of self-assembled Mesalamine - Sucralfate complex.

Drug-Drug Delivery Systems (DDDSs) start to prove their better efficacy mainly in cancer therapy. Zang and co-researchers have shown that a supramolecular DDDS composed of pure drugs provides a hopeful approach for cancer treatment. The proposed drug-drug delivery system was obtained via coassembly of Gefitinib (GEF) and tripeptide tyroservatide (YSV), two chemotherapeutic pharmaceuticals used for non-small-cell lung cancer. Various techniques (transmission electron microscopy and dynamic light scattering) have shown that GEF and YSV self-assemble into nanoparticles with regular morphology and uniform size, results in more efficient entering into cancer cells and inhibition of the proliferation of cancer cells compared with single GEF, YSV, or GEF/YSV drug mixture. *In vivo* experiments showed that the DDDS can selectively accumulate in tumor tissue, resulting in much better drug efficacy without evident side effects provides thus a promising route for enhanced anticancer therapy in nanomedicine [63].

Conclusion

From the discussed examples it becomes evident that Nature can assemble various building blocks to form more complex polysaccharide structures. This principle is also found in many synthetic or semi-synthetic self-assembled biomaterials such as cyclodextrins and triblock copolymers with Polyethylene Oxide (PEO) forming supramolecular structures like polyrotoxanes [67-69] or metallo-organic antifreeze proteins able to inhibit ice-grow based on a model find in nature [70]. Combinations of different categories of substances (i.e., polymers with lipids, peptides or proteins) used as excipients in the design of new drug delivery systems can be prepared based on the same principles of weak interactions, hydrophilic-hydrophobic balance and presence of ionic charges that can be used to tune a specific structure of a self-assembled system.

Transition from natural structures to synthetic ones and the similarity in how these systems can stabilize themselves may open a multitude of roads to build desired supramolecular structures for specific purposes in various fields related to nanotechnology.

Acknowledgments

The financial support from NSERC (Natural Science and Engineering Research Council) of Canada (Discovery Program) is gratefully acknowledged.

References

1. Whitesides GM, Boncheva M (2002) Beyond molecules: self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. P Natl Acad Sci USA 99: 4769-4774.
2. Caldorera-Moore ME, Liechty WB, Peppas NA (2011) Responsive theranostic systems: integration of diagnostic imaging agents and responsive controlled release drug delivery carriers. Acc Chem Res 44: 1061-1070
3. Maysinger D, Ji J, Hutter E, Cooper E (2015) Nanoparticle-Based and Bioengineered Probes and Sensors to Detect Physiological and Pathological Biomarkers in Neural Cells. Front Neurosci 9: 480.
4. Ariga K, Hill JP, Lee MV, Vinu A, Charvet R, et al. (2008) Challenges and breakthroughs in recent research on self-assembly. Sci Technol Adv Mater 9: 1-96.
5. Whitesides GM, Grzybowski B (2002) Self-assembly at all scales. Science 295: 2418-2421.
6. Hyde S, Blum Z, Landh T, Lidin S, Ninham BW, et al. (1996) Chapter 4 - Beyond Flatland: The Geometric Forms due to Self-Assembly. In: The Language of Shape: The Role of Curvature in Condensed Matter: Physics, Chemistry and Biology. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands. Pg No: 141-197.
7. Shuvaev VV, Ilies MA, Simone E, Zaitsev S, Kim Y, et al. (2011) Endothelial targeting of antibody-decorated polymeric filomicelles. ACS Nano 5: 6991-6999.
8. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, et al. (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. Nat Nanotechnol 2: 249-255.
9. Israelachvili JN, Mitchell DJ (1975) A model for the packing of lipids in bilayer membranes. Biochim Biophys Acta 389: 13-19.
10. Belman N, Israelachvili JN, Li Y, Safinya CR, Ezersky V, et al. (2011) Hierarchical superstructure of alkylamine-coated ZnS nanoparticle assemblies. Phys Chem Chem Phys 13: 4974-4979
11. Branco MC, Schneider JP (2009) Self-assembling materials for therapeutic delivery. Acta Biomater 5: 817-831.
12. Xu C, Kopeček J (2006) Self-Assembling Hydrogels. Polymer Bulletin 58: 53-63.

13. Löwik DW, van Hest JC (2004) Peptide based amphiphiles. Chem Soc Rev 33: 234-245.

14. Nagae M, Yamaguchi Y (2014) Three-dimensional structural aspects of protein-polysaccharide interactions. Int J Mol Sci 15: 3768-3783.

15. Jamadagni SN, Godawat R, Dordick JS, Garde S (2009) How interfaces affect hydrophobically driven polymer folding. J Phys Chem B 113: 4093-4101.

16. Rahimi M, Roberts TF, Armas-Perez JC, Wang X, Bukusoglu E, et al. (2015) Nanoparticle self-assembly at the interface of liquid crystal droplets. Proc Natl Acad Sci USA 112: 5297-5302.

17. van Oss CJ (2008) The Interfacial Tension/Free Energy of Interaction Between Water and Identical Condensed-phase Entities, I, Immersed in Water, w. In: The Properties of Water and Their Role in Colloidal and Biological Systems. 1stedn, Academic Press, Amsterdam, Netherlands.

18. Coviello T, Matricardi P, Marianecci C, Alhaique F (2007) Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. J Control Release 119: 5-24.

19. Rees DA, Welsh EJ (1977) Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. Angewandte Chemie International Edition 16: 214-224.

20. Ravenelle F, Rahmouni M (2006) Contramid®. High-Amylose Starch for Controlled Drug Delivery. In: Marchessault RH, Ravenelle F, Zhu XX (eds.). Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. 1stedn, ACS symposium series, Washington DC, USA. Pg No: 79-104.

21. Caillard R, Petit A, Subirade M (2009) Design and evaluation of succinylated soy protein tablets as delayed drug delivery systems. Int J Biol Macromol 45: 414-420.

22. Pistone S, Goycoolea FM, Young A, Smistad G, Hiorth M (2017) Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity. Eur J Pharm Sci 96: 381-389.

23. Martinez-Sanz M, Pettolino F, Flanagan B, Gidley MJ, Gilberl EP (2017) Structure of cellulose microfibrils in mature cotton fibres. Carbohydr Polym 175: 450-463.

24. Mateescu MA, Ispas-Szabo P, Assaad E (2014) Starch and derivatives as pharmaceutical excipients: From natura to pharmacy. In: Controlled Drug Delivery. The Role of Self-assembling Multi-task Excipients. 1stedn, Woodhead Publishing, Elsevier, UK. Pg No: 21-84.

25. Immel S, Lichtenthaler FW (2000) The Hydrophobic Topographies of Amylose and its Blue Iodine Complex. Starch 52: 1-8.

26. Appel EA, Tibbitt MW, Webber MJ, Mattix BA, Veiseh O, et al. (2015) Self-assembled hydrogels utilizing polymer-nanoparticle interactions. Nat Commun 6: 6295.

27. Le Tien C, Lacroix M, Ispas-Szabo P, Mateescu MA (2003) N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. J Control Release 93: 1-13.

28. Lenaerts V, Dumoulin Y, Mateescu MA (1991) Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. Journal of Controlled Release 15: 39-46.

29. Dumoulin Y, Alex S, Ispas-Szabo P, Cartilier L, Mateescub MA (1998) Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis. Carbohyd Pol 37: 361-370.

30. Lenaerts V, Moussa I, Dumoulin Y, Mebsout F, Chouinard F, et al. (1998) Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. J Control Release 53: 225-234.

31. Ispas-Szabo P, Ravenelle F, Hassan I, Preda M, Mateescu MA (2000) Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release. Carbohyd Res 323: 163-175.

32. Mateescu MA, Lenaerts V, Dumoulin Y, inventors; Laborharm Inc., assignee. Use of cross-linked amylose as a matrix for the slow release of biologically active compounds. Canada, US Patent US 5456921 A. 1995 Oct 10.

33. Cartilier L, Mateescu MA, Dumoulin Y, Lenaerts V, inventors; Laborharm Inc., assignee. Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets. Canada, US Patent US 5616343 A. 1993 Mar 25.

34. Charmi Khazraji A, Robert S (2013) Self-Assembly and Intermolecular Forces When Cellulose and Water Interact Using Molecular Modeling. J Nanomater 2013: 1-12.

35. Fu ZQ, Wang LJ, Zou H, Li D, Adhikari B (2014) Studies on the starch-water interactions between partially gelatinized corn starch and water during gelatinization. Carbohydr Polym 101: 727-732.

38. Biliaderis CG (1991) The structure and interactions of starch with food constituents. Can J Physiol and Pharmacol 69: 60-78.

37. Natarajan J, Movva S, Madras G, Chatterjee K (2017) Biodegradable galactitol based crosslinked polyesters for controlled release and bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 77: 534-547.

38. Palmer LC, Velichko YS, de la Cruz MO, Stupp SI (2007) Supramolecular self-assembly codes for functional structures. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 365: 1417-1433.

39. Mateescu MA, Ispas-Szabo P, Mulhbacher J (2006) Cross-linked Starch Derivatives for High Loaded Pharmaceutical Formulation. In: Marchessault R, Ravenelle F, Zhu XX (eds.). Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. 1st edn, ACS symposium series, Washington DC, USA. Pg no: 121-137.

40. Heinze T, Koschella A (2005) Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. Macromol Symp 223: 13-40.

41. Calinescu C, Mulhbacher J, Nadeau E, Fairbrother JM, Mateescu MA (2005) Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. Eur J Pharm Biopharm 60: 53-60.

42. Calinescu C, Nadeau E, Mulhbacher J, Fairbrother JM, Mateescu MA (2007) Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. Int J Pharm 343: 18-25.

43. Massicotte LP, Baille WE, Mateescu MA (2008) Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients. Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. Int J Pharm 358: 212-223.

44. Calinescu C, Mateescu MA (2008) Carboxymethyl high amylose starch. Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. Eur J Pharm Biopharm 70: 582-589.

45. Ispas-Szabo P, De Koninck P, Calinescu C, Mateescu MA (2017) Carboxymethyl Starch Excipients for Drug Chronodelivery. AAPS Pharm Sci Tech 18: 1673-1682.

46. Mateescu MA, Bustos IJ, Dumoulin Y, Ispas-Szabo P, (inventors); Axcan Pharma Inc., (assignee) Gastro-resistant enzyme pharmaceutical compositions. US Patent US PCT/IB2011/000579. 2011 Sep 22.

47. Luo Y, Wang Q (2014) Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. Int J Biol Macromol 64: 353-367.

48. Assaad E, Wang YJ, Zhu XX, Mateescu MA (2011) Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. Carbohyd Polym 84: 1399-1407.

49. Mateescu MA, Ispas-Szabo P, Assaad E (2014) Chitosan-based polyelectrolyte as pharmaceutical excipients. In: Controlled Drug Delivery. The Role of Self-assembling Multi-task Excipients. 1stedn, Woodhead Publishing, Elsevier, UK. Pg No: 133-156.

50. Mendes AC, Strohmenger T, Goycoolea F, Chronakis IS (2017) Electrostatic self-assembly of polysaccharides into nanofibers. Colloids and Surfaces A 531: 182-188.

51. Tian J, Xu S, Deng H, Song X, Li X, et al. (2017) Fabrication of self-assembled chitosan-dispersed LDL nanoparticles for drug delivery with a one-step green method. Int J Pharm 517: 25-34.

52. Zhu Y, Xuan H, Ren J, Ge L (2015) Self-healing multilayer polyelectrolyte composite film with chitosan and poly(acrylic acid). Soft Matter 11: 8452-8459.

53. Mateescu MA, Ispas-Szabo P, Assaad E (2014) Self-assembling in natural, synthetic and hybrid materials with application in drug delivery. In: Controlled Drug Delivery. The Role of Self-assembling Multi-task Excipients. (1stedn), Woodhead Publishing, Elsevier, UK. Pg no: 163-208.

54. Calinescu C, Mondovi B, Federico R, Ispas-Szabo P, Mateescu MA (2012) Carboxymethyl starch. Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. Int J Pharm 428: 48-56.

55. Osman Z, Arof AK (2003) FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. Electrochimica Acta 48: 993-999.

56. Kadir MF, Aspanut Z, Majid SR, Arof AK (2011) FTIR studies of plasticized poly(vinyl alcohol)-chitosan blend doped with NH4NO3 polymer electrolyte membrane. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 78: 1068-1074.

57. Verma G, Hassan PA (2013) Self assembled materials: design strategies and drug delivery perspectives. Phys Chem Chem Phys 15: 17016-17028.

58. Truong NP, Quinn JF, Whittaker MR, Davis TP (2016) Polymeric filomicelles and nanoworms: two decades of synthesis and application. Polym Chem 7: 4295-4312.

59. Tang Y, Heaysman CL, Willis S, Lewis AL (2011) Physical hydrogels with self-assembled nanostructures as drug delivery systems. Expert Opin Drug Deliv 8: 1141-1159.

60. Ispas-Szabo P, Friciu MM, Nguyen P, Dumoulin Y, Mateescu MA (2016) Novel self-assembled mesalamine-sucralfate complexes: preparation, characterization, and formulation aspects. Drug Dev Ind Pharm 42: 1183-1193.

61. Li Y, Lin J, Ma J, Song L, Lin H, et al. (2017) Methotrexate-Camptothecin Prodrug Nanoassemblies as a Versatile Nanoplatform for Biomodal Imaging-Guided Self-Active Targeted and Synergistic Chemotherapy. ACS Appl Mater Interfaces 9: 34650-34665.

62. Liang X, Gao C, Cui L, Wang S, Wang J, et al. (2017) Self-Assembly of an Amphiphilic Janus Camptothecin-Floxuridine Conjugate into Liposome-Like Nanocapsules for More Efficacious Combination Chemotherapy in Cancer. Adv Mater 29: doi: 10.1002/adma.201703135.

63. Zhang Z, Shi L, Wu C, Su Y, Qian J, et al. (2017) Construction of a Supramolecular Drug-Drug Delivery System for Non-Small-Cell Lung Cancer Therapy. ACS Appl Mater Interfaces 9: 29505-29514.

64. Hu M, Huang P, Wang Y, Su Y, Zhou L, et al. (2015) Synergistic Combination Chemotherapy of Camptothecin and Floxuridine through Self-Assembly of Amphiphilic Drug-Drug Conjugate. Bioconjug Chem 26: 2497-2506.

65. Neufeld L, Bianco-Peled H (2015) Designing a biocompatible hydrogel for the delivery of mesalamine. Int J Pharm 491: 170-179.

66. Aronson JK (2015) Mesalamine. In: Meyler's Side Effects of Drugs. The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands.

67. Li J, Loh XJ (2008) Cyclodextrin-based supramolecular architectures: syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 60: 1000-1017.

68. Zhang L, Su T, He B, Gu Z (2014) Self-assembly Polyrotaxanes Nanoparticles as Carriers for Anticancer Drug Methotrexate Delivery. Nano-Micro Letters 6: 108-115.

69. Li JJ, Zhao F, Li J (2011) Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 90: 427-443.

70. Mitchell DE, Clarkson G, Fox DJ, Vipond RA, Scott P, et al. (2017) Antifreeze Protein Mimetic Metallohelices with Potent Ice Recrystallization Inhibition Activity. J Am Chem Soc 139: 9835-9838.

A.3 Résumés publiés des communications orales

18 Novembre 2016
19ième Conférence du CBGRC
Université Concordia, Montréal, Canada

Study of Barium Sulfate Tablets as Possible Tracers in Inflammatory Bowel Diseases

Marc-André Labelle*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea-Alexandru Mateescu

In Europe, inflammatory bowel diseases (IBD) increases every year with about 260 000 new cases. The **objective** of this study is to obtain Barium Sulfate (BS) tablets carrying various charges and investigate their behavior as tracers in IBD. Current standard in imaging of IBD is BS used as radio-opacifier agent under a suspension form.
Hypothesis: selected biocompatible polymers such as starch and cellulose derivatives could generate matrices with a determined delivery time of BS at specific segments of gastro-intestinal tractus allowing an accurate x-ray imaging of the bowels. Matrix-forming polymers (anionic, cationic, neutral) were investigated in relation with the BS charge (between 10-80%) and tablets were obtained by direct compression. The effect of loading was monitored by tablet hardness, their hydration and behavior in simulated gastric and intestinal fluids. The **results** have shown a possible correlation between the loaded BS and the polarity of the functional groups grafted on polymeric chains. The anionic polymers CarboxyMethylCellulose and CarboxyMethylStarch could allow about 60% BS loading, thus being good matrices for delivery in small intestine. The HPMC (HydroxyPropylMethylCellulose, a neutral polymer) showed great stability at loadings up to 80% and could be recommended as carrier for BS colonic delivery.

8 Mai 2017
85ième Congrès de l'ACFAS
Université McGill, Montréal, Canada

Des comprimés de sulfate de baryum pour le diagnostic des dysfonctions intestinales

Marc-André Labelle*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea-Alexandru Mateescu

Problématique : Le diagnostic des dysfonctions intestinales par rayons-X se fait actuellement avec des suspensions de sulfate de baryum (SB). Afin d'augmenter le confort du patient et réduire la quantité de baryum ingérée, nous proposons l'utilisation des comprimés de SB. Objectifs : Développer des formulations capables de transporter et libérer localement une quantité suffisante de SB ciblée aux différents segments du trajet gastro-intestinal (TGI). Méthodologie : Des comprimés à base de différentes charges (10-80%) de SB et de biopolymères (dérivés d'amidon, de cellulose et chitosan) seront préparés par compaction directe. Évaluation *in vitro* du comportement dans des fluides gastrique (SGF) et intestinaux (SIF) simulés. Caractérisation structurale (DRX, IR, SEM) et de la dureté des comprimés. Résultats : CMS (carboxyméthyl amidon, anionique) et HPMC (hydroxypropylméthyl cellulose, neutre) résistent bien au passage gastrique *in vitro* en présence de SB. CMS se désintègrent rapidement dans les fluides intestinaux et seraient pertinent pour une livraison au petit intestin. HPMC et la combinaison CMS-Chitosan sont résistants au-delà de 8h dans SIF et donc proposés pour le colon. À des faibles concentrations SB n'apporte pas de changement significatif aux propriétés du comprimé. Conclusion : SB peut être incorporé à haute concentration dans des comprimés ciblés pour différents segments du TGI. Cette approche propose une alternative nouvelle pour le diagnostic et le développement de formulations orales.

A.4 Résumés publiés présentés par affiches

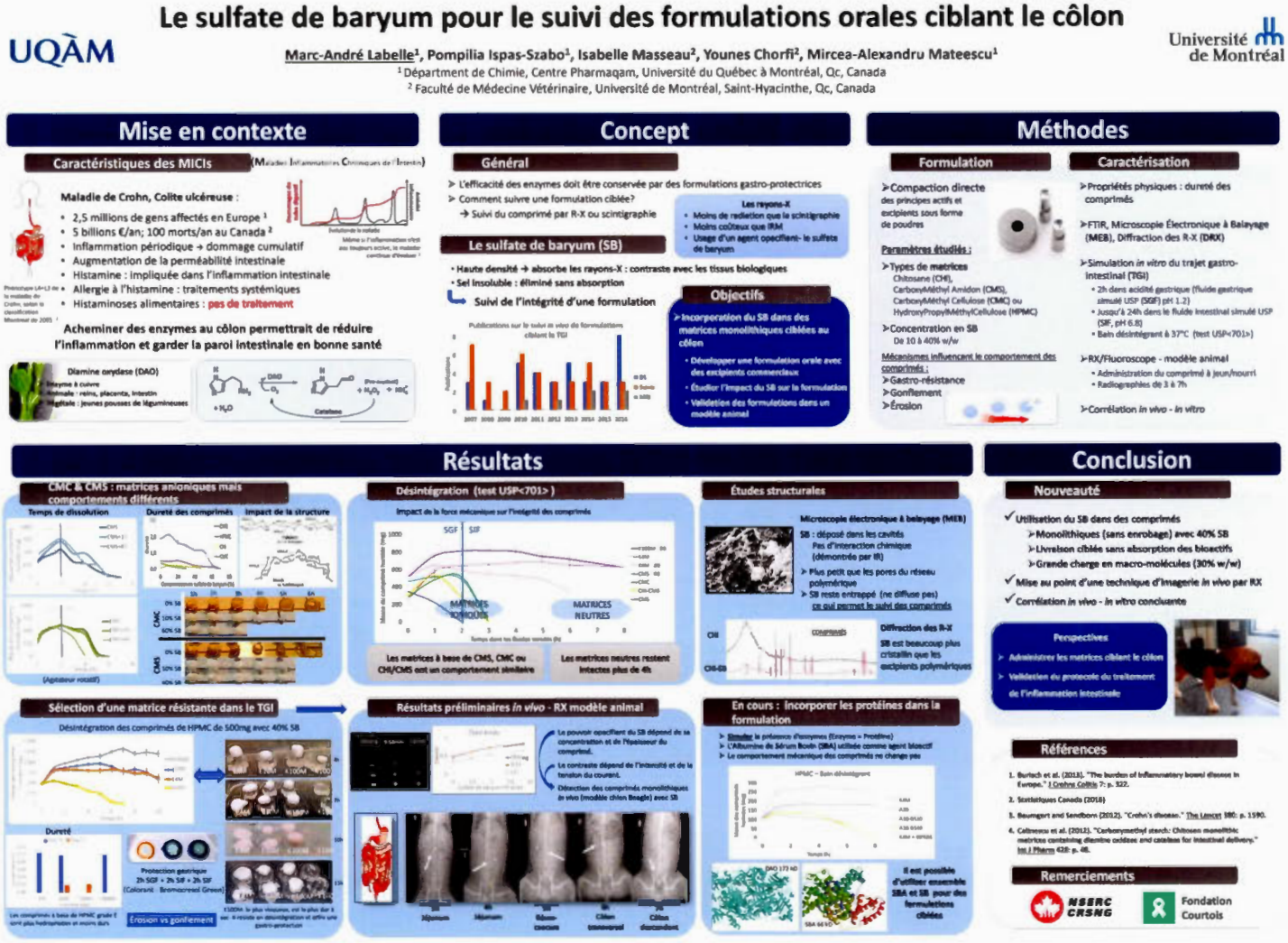


Figure A.1 Le sulfate de baryum pour le suivi des formulations orales ciblant le côlon. Le 13ième colloque annuel du centre de recherche Biomed, le 28 Avril 2017, Université du Québec à Montréal (UQÀM), Montréal, Québec, Canada.

Le sulfate de baryum pour le suivi des formulations orales ciblant le côlon

Le 13ième colloque annuel du centre de recherche Biomed, le 28 Avril 2017, Université du Québec à Montréal (UQÀM), Montréal, Québec, Canada

Marc-André Labelle[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Isabelle Masseau[2], Younes Chorfi[2], Mircea-Alexandru Mateescu[1]
[1] Département de Chimie, Centre Biomed, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada
[2] Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Les problématiques du développement des formulations orales ciblées sont reliées aux propriétés des agents bioactifs (par exemple la solubilité, la perméabilité, etc.) et à la physiologie gastro-intestinale (pH, mobilité, etc.). Malgré les caractérisations *in vitro* intensives pendant le développement des formulations pharmaceutiques, le comportement *in vivo* peut différer significativement, menant à une perte d'efficacité de la formulation ciblée. Présentement, la scintigraphie permet une traçabilité *in vivo* des comprimés mais comporte des limitations reliées à l'utilisation de radioisotopes. Cette étude déterminera la possibilité de formuler des comprimés contenant le sulfate de baryum (SB) et l'observation de leur comportement *in vivo* par radiographie.

Méthode : Différentes matrices polymériques contenant le SB ont été évaluées dans des fluides gastriques et intestinaux simulés. Les comprimés ont été obtenus par compression directe des poudres (excipients et principes actifs) et la concentration de SB variait entre 10 et 40% w/w. Les performances mécaniques des comprimés secs (dureté) et hydratés (poids, intégrité) furent analysés *in vitro*. Les formulations sélectionnées ont été étudiées sur un modèle chien beagle. Les comprimés ont été administrés par voie orale et des radiographies ont été prises à des intervalles de temps spécifiques. Des études structurales (FTIR, Diffraction des R-X, Microscopie Électronique à Balayage) furent aussi effectuées.

Résultats : Il fut observé que certains types de cellulose pouvaient générer des matrices stables avec SB. Ils ont été utilisés comme point de départ pour évaluer les formulations contenant divers agents bioactifs (par exemple des enzymes thérapeutiques). Les comprimés analysés par MEB ont montré que le SB s'accumule en surface comme une couche externe, empêchant les associations par liaisons H des macromolécules. Des études préliminaires de radiologie diagnostiques ont montré que le comprimé contenant le SB peut aisément être suivi durant le transit gastrique et intestinal offrant un bon contraste *in vivo* tout en maintenant leurs caractéristiques mécaniques.

Conclusion : Cette étude a montré l'utilisation potentielle du SB comme marqueur radiographique pour la traçabilité in vivo des formulations ciblées administrées oralement. La bonne corrélation *in vitro – in vivo* supporte le possible remplacement de l'approche scintigraphique par celle radiographique en utilisant des formulations contenant le SB, sécuritaires et moins coûteuses.

Barium sulfate as tracer for *in vivo* formulation follow-up and its impact on tablet integrity

UQÀM

Marc-André Labelle[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Isabelle Masseau[2], Younes Chorfi[2], Mircea-Alexandru Mateescu[1]

[1] Department of Chemistry, Pharmaqam centre, University of Quebec at Montreal, Qc, Canada

[2] Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Université de Montréal

Introduction

In vivo follow-up of tablets

In vitro tablets performance

Concept

Barium sulfate (BS)

- High density: absorbs X-rays
  - contrasts with biological tissues
- Insoluble salt: no bioavailability
  - Follow-up of formulation integrity
- Mucoadhesive
  - Coating of the GIT

Commercial product of barium sulfate suspension used for contrasting mucosa

OBJECTIVES

- **Incorporation of BS in colon targeted monolithic matrices**
- **Developp an oral formulation with commercial excipients**
- **Study the impact of BS on the formulation**
- **Validate selected formulations in animal model**

Methods

Formulation

- **Direct compaction**
  Active principle and excipients in form of mixed powder

Studied parameters:

- **Matrices types**
  Chitosan (CHI)
  CarboxyMethyl Starch (CMS)
  CarboxyMethyl Cellulose (CMC)
  HydroxyPropylMethyl Cellulose
- Concentration of **BS** (10 to 40% w/w)

Mechanisms influencing the tablets behavior

- Gastro-protection
- Hydrophilicity
- Swelling
- Erosion

Erosion Vs swelling

Characterisation

DRY PHASE

- tablet hardness
- structural studies (FTIR, **SEM**, X-Ray Diffraction (XRD)

WET PHASE

- *In vitro* simulation of the gastro-intestinal tract (**GIT**)
  - 2h in gatric acidity (Simulated Gastric Fluid USP (**SGF**) pH 1.2), Up to 24h in Simulated Intesnal Fluid USP (SIF, pH 6.8)
  - Disintegration bath, 37°C (test USP<701>)

IN VIVO TESTS

- X-rays on animal model
  - Administration fed state/empty stomach

In vivo - in vitro correlation

Results

Administration of a non-disintegrating HPMC grade

HydroxyPropyl Methyl Cellulose (HPMC)

R = varying ratios of
1) **Hydrogen** : -H
2) **Methyl** : $-CH_3$, hydrophobe
3) **HydroxyPropyl** : $-CH_2$-CHOH-CH_3, slightly hydrophile

	Type F	Type E
Methoxyl	29%	29%
Hydroxypropyl	10%	10%

Disintegration USP of different HPMC grade
HPMC grade K100M had the longest disintegration time. Grade E is more hydrophobic but has less cohesion

Administrations

#1 – After meal : disappeared (crushed or rejected)
#2 – After meal : adhesion to gastric mucosa for at least 4 hours
#3 – Fasted state : success (below)

Jejunum | Jejunum | Ileum caecum | Transversal colon | Descendant colon

Disintegration (test USP<701>)

Impact of mechanic forces on tablet integrity
Matrices with CMS, CMC and CHI/CMS have similar behavior. Neutral matrices keep their integrity for over 8h
1500mg tablet, ϕ=9.5mm, 2T, 10s!

Hypothesis : 2 phenomenons in vivo, absent in vitro

Fasted state
Gel loss by contact with mucosa

With food bolus
Breaking by hard/semi-hard food chunks

Scanning electron microscopy (SEM)

Barium sulfate:

- Deposed in pores
- No interaction with polymer
- Smaller than polymer pores
- Trapped (will not defuse)

This will allow the tablet follow-up

X-rays opacifying strength

Depends of:
- BS loading
- Tablet shape.
- Instrument parameters

In-process : incorporate proteins in the formulation

- **Simulate** the presence of enzymes with proteins
- Bovin Serum Albumine (**BSA**) is used as bioactiv agent
- Mecanical behavior of the tablet did not change in the SGF/SIF media

BS	BSA	HPMC	Second polymer	Disintegration SGF/SIF	SIF	Dog
40%		K100M 60%		> 10h		> 7h
40%	10%	K100M 30%		> 7h	2h	
40%	30%	K100M 25%	CMC 5%	> 7h		
40%	30%	K100M 20%	CMC 10%	6h		
40%		E4M 60%		> 10h		-
40%	10%	E4M 12%	CMC 18%	2h30	< 1h	1h30
40%	30%	E4M 12%	CMS 18%	4h	1h30	

Final objective : colonic delivery of therapeutic enzymes

Hypothesis :
- Dog gastric pH is variable
- Protection of proteins in stomach

Solutions :
→Adapt simulated fluids
→Pentagastrine
→Coating (pectin, gum)

Conclusions

✓ Novelty : uses of BS in tablets
- Monolithics (without coating) with 40% BS
- Targeted delivery of bioactives to colon (without absorption)
- High charge in macromolecules (30% w/w)

✓ Setup of an *in vivo* imaging technic with X-rays

✓ Good *in vivo – in vitro* correlation for HPMC with 40% BS

PERSPECTIVES

- Optimize the formulations to obtain a good *in vivo – in vitro* correlation for different bioactives and different charges
- Administration of active compounds to canine model with IBD

Special thanks

NSERC CRSNG | Fondation Courtois | QAM | CINBAR | Colocon

Bibliography

1. Tedrow and Fahmy, (2014) Int J Pharm 472: 27
2. Moreno, Del Curto and al. (2015) Int J Pharm 497: 372
3. Pepin, (2015) Optics and Photonics News 26: 24

Figure A.2 Barium sulfate as tracer for *in vivo* formulation follow-up and its impact on tablet properties. Joint conference of CSPS/CC-CRS. 2017, Montréal, Québec, Canada.

Barium sulfate as tracer for *in vivo* formulation follow-up and its impact on tablet properties

Joint conference of CSPS/CC-CRS. 2017, Montréal, Québec, Canada.

Marc-André Labelle[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Isabelle Masseau[2], Younes Chorfi[2], Mircea-Alexandru Mateescu[1]
[1] Department of Chemistry, Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada
[2] Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

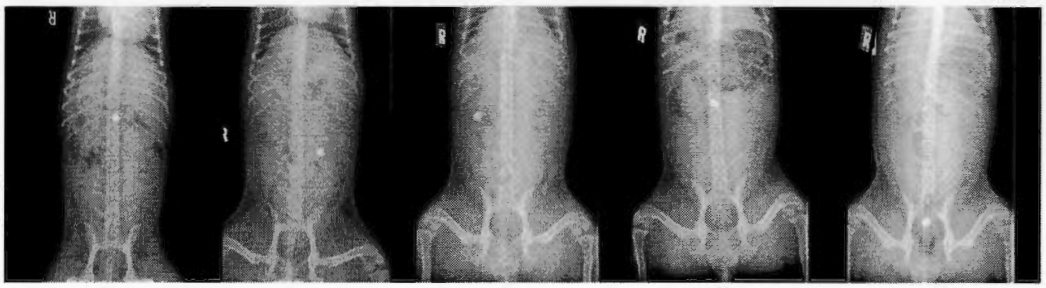
Purpose: The challenging development of targeted formulations administrated orally is related to the properties of bioactive agents (i.e. solubility, permeability, etc.) and the gastro-intestinal (**GI**) physiology (pH, motility, etc.). Despite the extensive *in vitro* characterization during formulation development, the *in vivo* behavior could markedly differ, leading to a loss of efficacy of targeted dosage forms. Scintigraphy, the current technic offering *in vivo* traceability of oral dosage forms, has some limitations related to use of radioisotopes. The present study investigates the possibility to formulate solid dosage forms containing barium sulfate (**BS**) and follow their behavior *in vivo* using radiography.

Methods: Various polymeric matrices containing BS were evaluated in simulated gastric and intestinal fluids. Tablets were obtained by direct compression and the BS loading varied between 10% and 40%. Mechanical performance of tablets in dry (hardness measurements) and swollen form (weight and size) were followed *in vitro*. Selected formulations were administrated to beagle dogs and radiographs were taken at specific time points. Structural characterization (IR, DRX and SEM) was also performed.

Results: It was found that selected cellulose grades generate stable matrices loaded with BS. They were used as templates to evaluate targeted formulations loaded with various bioactive agents (i.e. therapeutic enzymes). SEM of tablets showed a BS accumulation as an outer layer, preventing H-association between macromolecules. Preliminary radiology results have shown that the tablets containing BS can be easily followed during their transit throughout the GI tract offering excellent contrast *in vivo* while maintaining their mechanical (**Fig.1**).

Conclusion: The study showed the potential use of BS as a radiographic marker for *in vivo* traceability of targeted formulations orally administrated. The good *in vivo - in vitro* correlation supports the possible replacement of scintigraphy by safe and less costly BS-containing formulations.

Fig.1: Ventrodorsal radiographs of a monolithic tablet carrying BS during GI transit in beagle dog (administration at 0h)



3h	4h	5h	6h	7h
Jejunum	Jejunum	Ileum-caecum	Colon	Descending colon

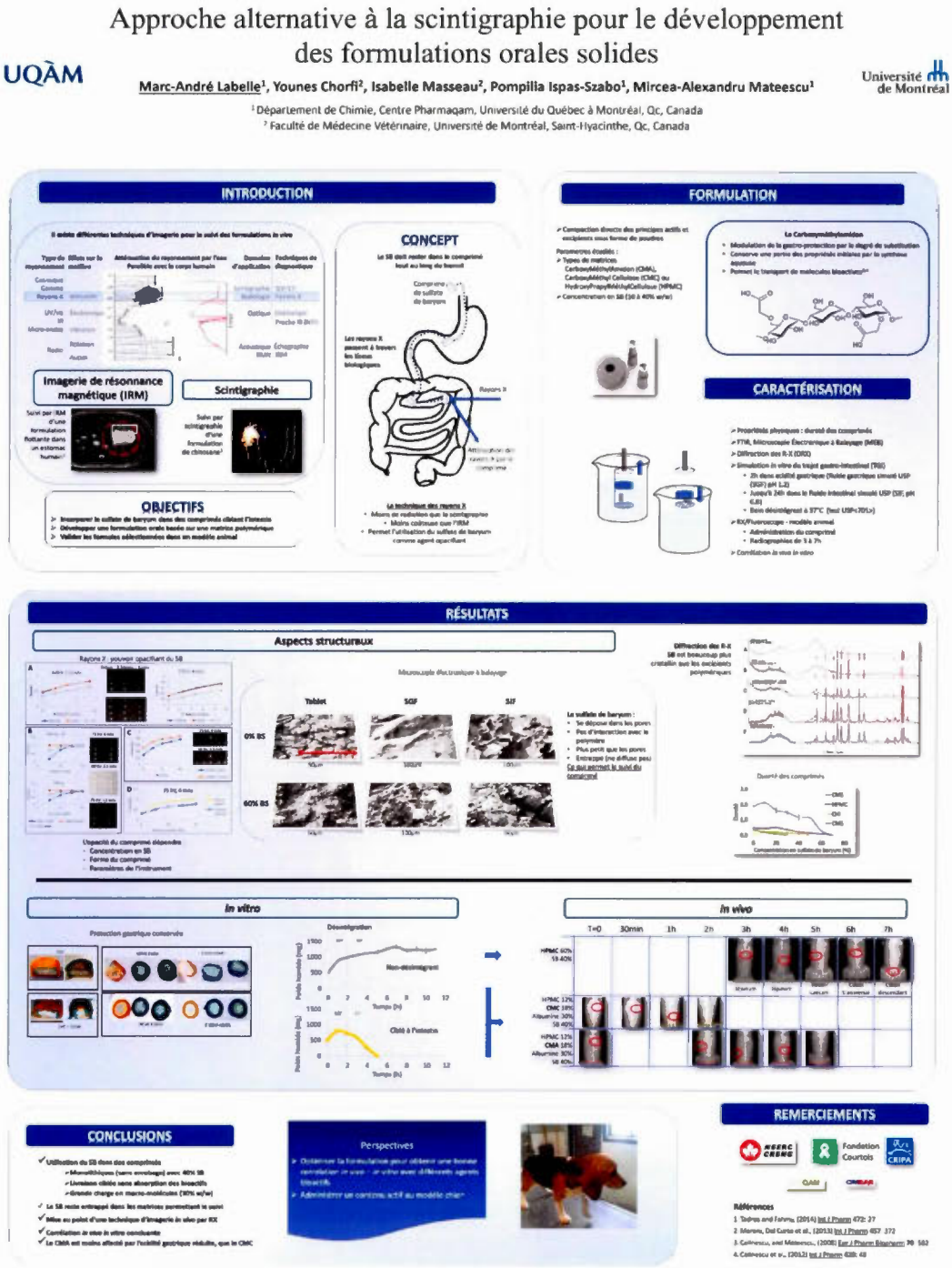


Figure A.3 Approche alternative à la scintigraphie pour le développement des formulations orales solides. La 7ième édition du colloque annuel du RQRM. 30 Septembre et 1er Octobre 2017, Québec, Québec, Canada.

Approche alternative à la scintigraphie pour le développement des formulations orales solides

La 7ième édition du colloque annuel du RQRM. 30 Septembre et 1er Octobre 2017, Québec, Québec, Canada.

Marc-André Labelle[1], Chorfi Younes[2], Isabelle Masseau[2], Pompilia Ispas-Szabo[1], Mircea-Alexandru Mateescu[1],

[1] Département de Chimie, Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada
[2] Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Introduction - Le projet propose une nouvelle technique de suivi des formulations orales contenant des agents bioactifs destinés à un traitement de l'inflammation intestinale. Le sulfate de baryum (SB) incorporé dans les comprimés permettra de suivre leur trajet *in vivo*, confirmant la livraison ciblée des agents bioactifs.

Objectifs – Étudier l'impact du SB dans des formulations orales et corréler les temps de désintégration des comprimés *in vitro* avec leur transit dans un modèle animal. Comparer l'effet des différents types de matrices polymériques et leur efficacité gastro-protectrice pour des formulations ciblées

Méthodologie –Le CarboxyMéthylAmidon (CMA), le CarboxyMéthylCellulose (CMC), qui sont des polymères anioniques et le HydroxyPropylMéthylCellulose (HPMC) qui est neutre, ont été utilisés pour générer des systèmes de transport et de control de la libération du principe actif. Ces matrices sont formées par compaction directe des mélanges de poudres avec le SB utilisé comme traceur. Les comprimés ont été testés *in vitro* dans les fluides digestifs simulés et caractérisés du point de vue structurale par microscopie électronique à balayage (MEB), diffraction des rayons X (DRX) et spectroscopie infrarouge (FTIR). L'étude *in vivo* a été réalisée par rayons X dans un chien beagle.

Résultats – La MEB a montré que le SB reste entrappé dans les matrices polymériques, ce qui permettra le suivi par rayon X. Les différentes formulations ciblant l'intestin analysées *in vitro* ont été administrées dans le modèle animal et une bonne corrélation *in vivo in vitro* a été observée pour le CMA et le HPMC comparé au CMC qui s'est désintégré plus rapidement *in vivo.*

Conclusion – Le SB, par sa grande insolubilité, a peu d'impact sur les formulations et permet un suivi adéquat par rayons X du comprimé dans le modèle animal à une concentration de 40% w/w. Son integration dans les comprimés est facile et cet approche peut remplacer la scintigraphie dans les études du developpment des médicamants. La bonne corrélation *in vitro in vivo* du CMA prouve qu'il est un excipient adéquat pour des formulations ciblées à l'intestin.

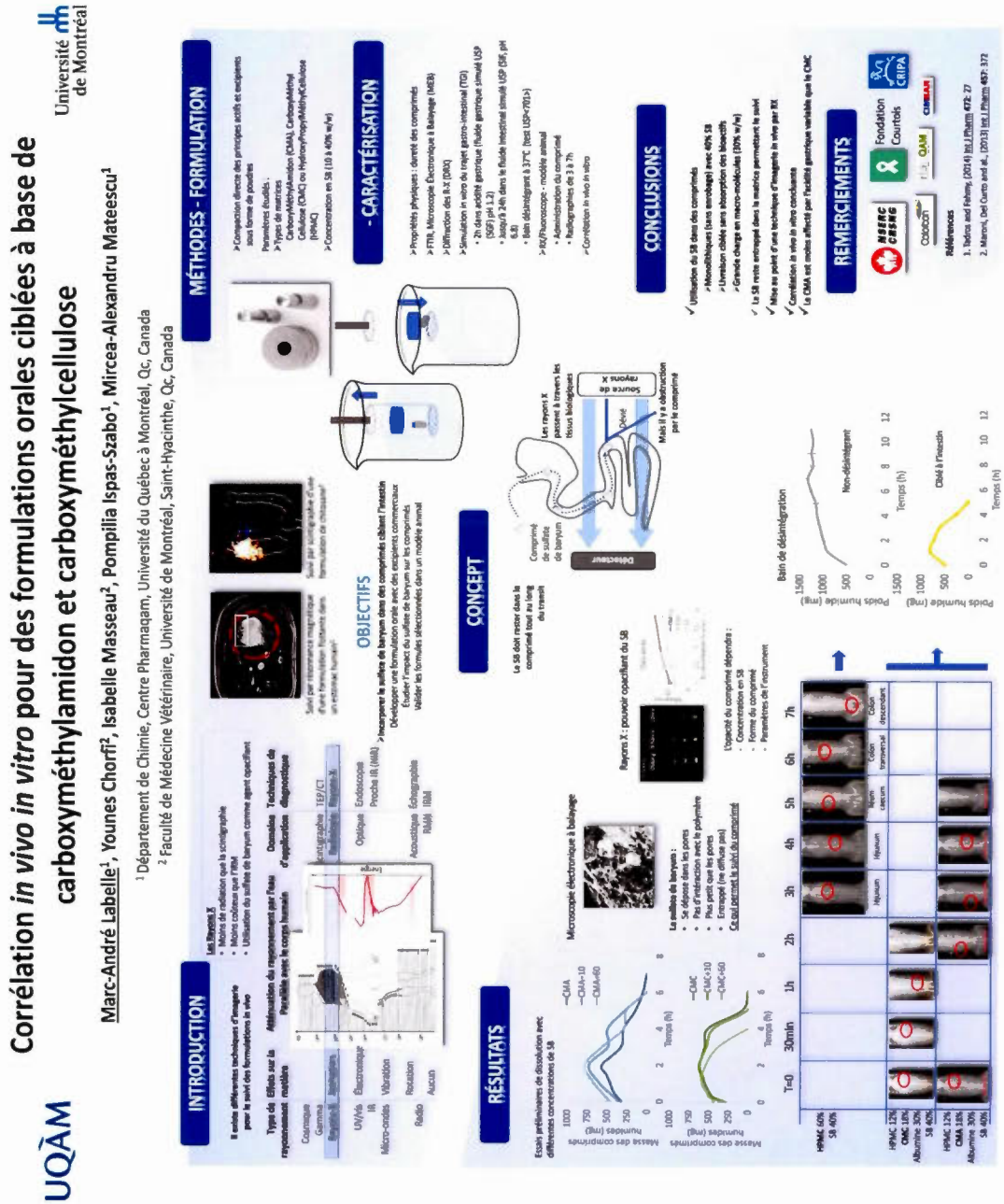


Figure A.4 Corrélation *in vivo in vitro* pour des formulations orales ciblées à base de carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose. Pharmaqam 2017, UQÀM, Montréal, Québec, Canada

Corrélation *in vivo in vitro* pour des formulations orales ciblées à base de carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose

Pharmaqam 2017, UQÀM, Montréal, Québec, Canada

Marc-André Labelle[1], Mircea-Alexandru Mateescu[1], Pompilia Ispas-Szabo[1], Chorfi Younes[2], Isabelle Masseau[2]

[1] Département de Chimie, Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Qc, Canada
[2] Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Concept - Le projet propose une nouvelle technique de suivi des formulations orales contenant des agents bioactifs destinés à un traitement local à l'intestin grêle. Le sulfate de baryum (SB) incorporé dans les comprimés permettra de suivre leur trajet *in vivo*, confirmant la livraison ciblée des agents bioactifs.

Objectifs - Corréler les temps de désintégration des comprimés *in vitro* avec leur transit dans un modèle animal et comparer l'impact des différents types de matrices polymériques et leur efficacité gastro-protectrice.

Méthodologie - Les comprimés monolithiques contenant le SB comme traceur ont été testés *in vitro* dans les fluides digestifs simulés. L'étude *in vivo* a été réalisée par rayons X dans un chien beagle.

Résultats - Une bonne corrélation *in vivo in vitro* a été observée pour le carboxyméthyl amidon (CMA) comparé au carboxyméthyl cellulose.

Conclusion – Le CMA est un excipient adéquat pour des formulations ciblées à l'intestin.

RÉFÉRENCES

Adityawarman, D., Voigt, A., Veit, P. et Sundmacher, K. (2005). Precipitation of nanoparticles in a non-ionic microemulsion: Identification of suitable control parameters. *Chem Eng Sci, 60*(12), 3373-3381.

Aguirre, T.A., Aversa, V., Rosa, M., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Coulter, I. et Brayden, D.J. (2016). Coated minispheres of salmon calcitonin target rat intestinal regions to achieve systemic bioavailability: Comparison between intestinal instillation and oral gavage. *J Control Release, 238*, 242-252.

Ahmed, I.S. et Ayres, J.W. (2007). Bioavailability of riboflavin from a gastric retention formulation. *Int J Pharm, 330*(1-2), 146-154.

Ahmed, I.S. et Ayres, J.W. (2011). Comparison of in vitro and in vivo performance of a colonic delivery system. *Int J Pharm, 409*(1-2), 169-177.

Al-Remawi, M. (2012). Properties of Chitosan Nanoparticles Formed Using Sulfate Anions as Crosslinking Bridges. *Am J Appl Sci, 9*(7), 1091-1100.

Alabiso, M.E., Iasiello, F., Pellino, G., Iacomino, A., Roberto, L., Pinto, A., . . . Reginelli, A. (2016). 3D-EAUS and MRI in the Activity of Anal Fistulas in Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract, 2016*, 8.

Ali, J., Arora, S., Ahuja, A., Babbar, A.K., Sharma, R.K., Khar, R.K. et Baboota, S. (2007). Formulation and development of hydrodynamically balanced system for metformin: in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm, 67*(1), 196-201.

Ambrosini, R., Barchiesi, A., Di Mizio, V., Di Terlizzi, M., Leo, L., Filippone, A., . . . Carriero, A. (2007). Inflammatory chronic disease of the colon: how to image. *Eur J Radiol, 61*(3), 442-448.

Anande, N.M., Jain, S.K. et Jain, N.K. (2008). Con-A conjugated mucoadhesive microspheres for the colonic delivery of diloxanide furoate. *Int J Pharm, 359*(1-2), 182-189.

Aoyagi, N., Ogata, H., Kaniwa, N., Uchiyama, M., Yasuda, Y. et Tanioka, Y. (1992). Gastric Emptying of Tablets and Granules in Humans, Dogs, Pigs, and Stomach-Emptying-Controlled Rabbits. *J Pharm Sci, 81*(12), 1170-1174.

Arndt, M., Chokshi, H., Tang, K., Parrott, N.J., Reppas, C. et Dressman, J.B. (2013). Dissolution media simulating the proximal canine gastrointestinal tract in the fasted state. *Eur J Pharm Biopharm, 84*(3), 633-641.

Assaad, E. et Mateescu, M.A. (2010). The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics. *Int J Pharm, 394*(1-2), 75-84.

Assaad, E., Wang, Y.J., Zhu, X.X. et Mateescu, M.A. (2011). Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. *Carbohyd Polym, 84*(4), 1399-1407.

Bala, H., Fu, W., Zhao, J., Ding, X., Jiang, Y., Yu, K. et Wang, Z. (2005). Preparation of BaSO4 nanoparticles with self-dispersing properties. *Colloid Surface, 252*(2-3), 129-134.

Barbosa, C.H., Carvalho, A.C., de Souza, S., Machado, F., Guedes, F., Monteiro, A. et Schanaider, A. (2015). A Novel Restraining Device for Small Animal Imaging Exams: Validation in Rabbits. *Biomed Res Int, 2015*, 571-729.

Barnett, B.P., Arepally, A., Stuber, M., Arifin, D.R., Kraitchman, D.L. et Bulte, J.W. (2011). Synthesis of magnetic resonance-, X-ray- and ultrasound-visible alginate microcapsules for immunoisolation and noninvasive imaging of cellular therapeutics. *Nat Protoc, 6*(8), 1142-1151.

Baumgart, D.C. et Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet, 369*(9573), 1641-1657.

Baumgart, D.C. et Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. *Lancet, 380*(9853), 1590-1605.

Baumgartner, S., Kristl, J., Vrečer, F., Vodopivec, P. et Zorko, B. (2000). Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *Int J Pharm, 195*(1-2), 125-135.

Bennett, A.D., MacPhail, C.M., Gibbons, D.S. et Lappin, M.R. (2010). A comparative study evaluating the esophageal transit time of eight healthy cats when pilled with the FlavoRx pill glide versus pill delivery treats. *J Feline Med Surg, 12*(4), 286-290.

Bernstein, C.N., Greenberg, H., Boult, I., Chubey, S., Leblanc, C. et Ryner, L. (2005). A prospective comparison study of MRI versus small bowel follow-through in recurrent Crohn's disease. *Am J Gastroenterol, 100*(11), 2493-2502.

Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy, 7*(3), 56.

Bhalekar, M.R., Bargaje, R.V., Upadhaya, P.G., Madgulkar, A.R. et Kshirsagar, S.J. (2016). Formulation of mucoadhesive gastric retentive drug delivery using thiolated xyloglucan. *Carbohydr Polym, 136*, 537-542.

Bhandari, P.N. et Hanna, M.A. (2011). Preparation of highly substituted carboxymethyl starch using a twin-screw extruder. *Starch - Stärke, 63*(12), 771-779.

Bishop, J.L., Lane, M.D., Dyar, M.D., King, S.J., Brown, A.J. et Swayze, G.A. (2014). Spectral properties of Ca-sulfates: Gypsum, bassanite, and anhydrite. *Am Mineral, 99*(10), 2105-2115.

Bonaventure, T., Goere, D., Boige, V. et Pocard, M. (2009). Beware of PET-CT results in cases of cancer occurring in the setting of chronic inflammatory bowel disease. *J Chir (Paris), 146*(6), 579-582.

Brewer, S., McPherson, M., Fujiwara, D., Turovskaya, O., Ziring, D., Chen, L., . . . Braun, J. (2008). Molecular imaging of murine intestinal inflammation with 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose and positron emission tomography. *Gastroenterology, 135*(3), 744-755.

Buchholz, K. et Seibel, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydr Res, 343*(12), 1966-1979.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. et Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol, 23*(2), 85-112.

Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L. et EpiCom, E. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis, 7*(4), 322-337.

Burke, K.F., Broussard, J.D., Ruaux, C.G., Suchodolski, J.S., Williams, D.A. et Steiner, J.M. (2013). Evaluation of fecal alpha1-proteinase inhibitor concentrations in cats with idiopathic inflammatory bowel disease and cats with gastrointestinal neoplasia. *Vet J, 196*(2), 189-196.

Calinescu, C. et Mateescu, M.A. (2008). Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm, 70*(2), 582-589.

Calinescu, C., Mondovi, B., Federico, R., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M.A. (2012). Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *Int J Pharm, 428*(1-2), 48-56.

Calinescu, C., Mulhbacher, J., Nadeau, E., Fairbrother, J.M. et Mateescu, M.A. (2005). Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for Escherichia coli oral formulations. *Eur J Pharm Biopharm, 60*(1), 53-60.

Calinescu, C., Nadeau, E., Mulhbacher, J., Fairbrother, J.M. et Mateescu, M.A. (2007). Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. *Int J Pharm, 343*(1-2), 18-25.

Cammarota, T., Sarno, A., Robotti, D., Bonenti, G., Debani, P., Versace, K., . . . Pera, A. (2009). US evaluation of patients affected by IBD: how to do it, methods and findings. *Eur J Radiol, 69*(3), 429-437.

Caobelli, F., Evangelista, L., Quartuccio, N., Familiari, D., Altini, C., Castello, A., . . . Young Aimn Working, G. (2016). Role of molecular imaging in the management of patients affected by inflammatory bowel disease: State-of-the-art. *World J Radiol, 8*(10), 829-845.

Cartilier, L., Mateescu, M.A., Dumoulin, Y. et Lenaerts, V. (1997). *Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets*. US Patent No. 5,616,343.

Celkan, A., Acartürk, F., Tuğcu-Demiröz, F., Gökçora, N., Akkaş, B.E. et Güner, L.A. (2016). Gamma scintigraphic studies on guar gum-based compressed coated tablets for colonic delivery of theophylline in healthy volunteers. *J Drug Deliv Sci Technol, 32*, 31-37.

Choudhary, S., Jain, A., Amin, M.C., Mishra, V., Agrawal, G.P. et Kesharwani, P. (2016). Stomach specific polymeric low density microballoons as a vector for extended delivery of rabeprazole and amoxicillin for treatment of peptic ulcer. *Colloids Surf B Biointerfaces, 141*, 268-277.

Choy, S.Y., Prasad, K.N., Wu, T.Y., Raghunandan, M.E. et Ramanan, R.N. (2016). Performance of conventional starches as natural coagulants for turbidity removal. *Ecol Eng, 94*, 352-364.

Cohen, R., Orlova, Y., Kovalev, M., Ungar, Y. et Shimoni, E. (2008). Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. *J Agric Food Chem, 56*(11), 4212-4218.

Coultate, T.P. (2009). Chapter 3 - Polysaccharides. Dans *Food: The Chemistry of Its Components* (5ième éd., p. 41) : Royal Society of Chemistry.

Cury, B.S., Castro, A.D., Klein, S.I. et Evangelista, R.C. (2009). Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. *Int J Pharm, 371*(1-2), 8-15.

Cury, B.S.F., de Castro, A.D., Klein, S.I. et Evangelista, R.C. (2009). Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. *Carbohydr Polym, 78*(4), 789-793.

Dambha, F., Tanner, J. et Carroll, N. (2014). Diagnostic imaging in Crohn's disease: what is the new gold standard? *Best Pract Res Clin Gastroenterol, 28*(3), 421-436.

Delisle, B., Calinescu, C., Mateescu, M.A., Fairbrother, J.M. et Nadeau, E. (2012). Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *J Pharm Pharm Sci, 15*(5), 642-656.

Dev, R.K., Bali, V. et Pathak, K. (2011). Novel microbially triggered colon specific delivery system of 5-Fluorouracil: statistical optimization, in vitro, in vivo, cytotoxic and stability assessment. *Int J Pharm, 411*(1-2), 142-151.

Dey, S., Mazumder, B., Chattopadhyay, S., Das, M.K., Sinha, S., Ganguly, S., . . . Mishra, M. (2014). Polymers derived from Xanthomonas campesteris and Cyamopsis tetragonolobus used as retardant materials for the formulation of sustained release floating matrix tablet of atenolol. *Int J Biol Macromol, 65*, 346-356.

Dey, S.K., De, P.K., De, A., Ojha, S., De, R., Mukhopadhyay, A.K. et Samanta, A. (2016). Floating mucoadhesive alginate beads of amoxicillin trihydrate: A facile approach for H. pylori eradication. *Int J Biol Macromol, 89*, 622-631.

Dios, P., Nagy, S., Pal, S., Pernecker, T., Kocsis, B., Budan, F., . . . Devay, A. (2015). Preformulation studies and optimization of sodium alginate based floating drug delivery system for eradication of Helicobacter pylori. *Eur J Pharm Biopharm, 96*, 196-206.

Dressman, J.B. (1986). Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharm Res, 3*(3), 123-131.

Dumoulin, Y., Alex, S., Ispas-Szabo, P., Cartilier, L. et Mateescu, M.A. (1998). Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis. *Carbohyd Polym, 37*(4), 361-370.

Dunn, L.B. et Krueger, W.J. (1999). Branching ratios of starch via proton nuclear magnetic resonance and their use in determining amylose/amylopectin content: Evidence for three types of amylopectin. *Macromol Symp, 140*(1), 179-186.

El-Zahaby, S.A., Kassem, A.A. et El-Kamel, A.H. (2014). Design and evaluation of gastroretentive levofloxacin floating mini-tablets-in-capsule system for eradication of Helicobacter pylori. *Saudi Pharm J, 22*(6), 570-579.

ElMeshad, A.N. et El-Ashmoony, M.M. (2012). Floating furosemide gel beads: in vitro and in vivo evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol, 22*(4), 317-325.

Fang, Y.-y., Wang, L.-j., Li, D., Li, B.-z., Bhandari, B., Chen, X.D. et Mao, Z.-h. (2008). Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties. *Carbohydr Polym, 74*(3), 379-384.

Friciu, M., Canh Le, T., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M.A. (2013). Carboxymethyl starch and lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic mesalamine forms for colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm, 85*(3 Pt A), 521-530.

Fromm, K.M. (2013). Barium bright and heavy. *Nat Chem, 5*, 146.

Gatta, G., Di Grezia, G., Di Mizio, V., Landolfi, C., Mansi, L., De Sio, I., . . . Grassi, R. (2012). Crohn's disease imaging: a review. *Gastroenterol Res Pract, 2012*, 816920.

Ghahremani, G.G., Gore, R.M., Breuer, R.I. et Larson, R.H. (1982). Esophageal manifestations of Crohn's disease. *Gastrointest Radiol, 7*(3), 199-203.

Ghimire, M., Hodges, L.A., Band, J., Lindsay, B., O'Mahony, B., McInnes, F.J., . . . Stevens, H.N. (2011). Correlation between in vitro and in vivo erosion behaviour of erodible tablets using gamma scintigraphy. *Eur J Pharm Biopharm, 77*(1), 148-157.

Ghimire, M., Hodges, L.A., Band, J., O'Mahony, B., McInnes, F.J., Mullen, A.B. et Stevens, H.N. (2010). In-vitro and in-vivo erosion profiles of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) matrix tablets. *J Control Release, 147*(1), 70-75.

Ghimire, M., McInnes, F.J., Watson, D.G., Mullen, A.B. et Stevens, H.N. (2007). In-vitro/in-vivo correlation of pulsatile drug release from press-coated tablet formulations: a pharmacoscintigraphic study in the beagle dog. *Eur J Pharm Biopharm, 67*(2), 515-523.

Gidley, M.J. et Bociek, S.M. (1988). Carbon-13 CP/MAS NMR studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules: relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state carbon-13 chemical shifts. *J Am Chem Soc, 110*(12), 3820-3829.

Goodman, K., Hodges, L.A., Band, J., Stevens, H.N., Weitschies, W. et Wilson, C.G. (2010). Assessing gastrointestinal motility and disintegration profiles of magnetic tablets by a novel magnetic imaging device and gamma scintigraphy. *Eur J Pharm Biopharm, 74*(1), 84-92.

Goto, T., Tanida, N., Yoshinaga, T., Sato, S., Ball, D.J., Wilding, I.R., . . . Fujimura, A. (2004). Pharmaceutical design of a novel colon-targeted delivery system using two-layer-coated tablets of three different pharmaceutical formulations, supported by clinical evidence in humans. *J Control Release, 97*(1), 31-42.

Gotthardt, M., Bleeker-Rovers, C.P., Boerman, O.C. et Oyen, W.J.G. (2013). Imaging of Inflammation by PET, Conventional Scintigraphy, and Other Imaging Techniques. *J Nucl Med Technol, 41*(3), 157-169.

Grand View Research, I. (2018). *Modified Starch Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Starch Esters & Ethers, Resistant Starch, Cationic Starch, Pre-gelatinized), By Application, By Region, And Segment Forecasts 2018 - 2024*. (Market Research Report 978-1-68038-827-5).

Guan, J., Zhou, L., Nie, S., Yan, T., Tang, X. et Pan, W. (2010). A novel gastric-resident osmotic pump tablet: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm, 383*(1-2), 30-36.

Gupta, R., Prajapati, S.K., Pattnaik, S. et Bhardwaj, P. (2014). Formulation and evaluation of novel stomach specific floating microspheres bearing famotidine for treatment of gastric ulcer and their radiographic study. *Asian Pac J of Trop Biomed, 4*(9), 729-735.

Hamori, M., Nagano, K., Kakimoto, S., Naruhashi, K., Kiriyama, A., Nishimura, A. et Shibata, N. (2016). Preparation and pharmaceutical evaluation of acetaminophen nano-fiber tablets: Application of a solvent-based electrospinning method for tableting. *Biomed Pharmacother, 78*, 14-22.

Hancock, R.D. et Tarbet, B.J. (2000). The Other Double Helix—The Fascinating Chemistry of Starch. *J Chem Educ, 77*(8), 988.

Hara, A.K., Leighton, J.A., Heigh, R.I., Sharma, V.K., Silva, A.C., De Petris, G., . . . Fleischer, D.E. (2006). Crohn disease of the small bowel: preliminary comparison among CT enterography, capsule endoscopy, small-bowel follow-through, and ileoscopy. *Radiology, 238*(1), 128-134.

Hatton, G.B., Yadav, V., Basit, A.W. et Merchant, H.A. (2015). Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans. *J Pharm Sci, 104*(9), 2747-2776.

Heinze, T. et Koschella, A. (2005). Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. *Macromol Symp, 223*(1), 13-40.

Herlinger, H. (1999). *Clinical Imaging of the Small Intestine*. (2nd éd.BerlinSpringer-Verlag.

Hodges, L.A., Connolly, S.M., Band, J., O'Mahony, B., Ugurlu, T., Turkoglu, M., . . . Stevens, H.N. (2009). Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin-HPMC tablets in healthy volunteers. *Int J Pharm, 370*(1-2), 144-150.

Hodges, L.A., Sime, K.A., Creech, L.A., Connolly, S.M., Barclay, S.T., Kwon, M.C., . . . Park, J.S. (2013). Pharmacoscintigraphy confirms consistent tamsulosin release from a novel triple-layered tablet. *Int J Pharm, 454*(1), 41-46.

Horton, R.E., Ross, F.G.M. et Darling, G.H. (1965). Determination of the Emptying-time of the Stomach by Use of Enteric-coated Barium Granules. *Br Med J, 1*, 1537.

Huprich, J.E. et Fletcher, J.G. (2009). CT enterography: principles, technique and utility in Crohn's disease. *Eur J Radiol, 69*(3), 393-397.

Immel, S. et Lichtenthaler, F.W. (2000). The Hydrophobic Topographies of Amylose and its Blue Iodine Complex. *Starch - Stärke, 52*(1), 1-8.

Ispas-Szabo, P., De Koninck, P., Calinescu, C. et Mateescu, M.A. (2016). Carboxymethyl Starch Excipients for Drug Chronodelivery. *AAPS PharmSciTech, 18*, 1673.

Ispas-Szabo, P., Ravenelle, F., Hassan, I., Preda, M. et Mateescu, M.A. (2000). Structure–properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release. *Carbohyd Res, 323*(1-4), 163-175.

Jain, A., Jain, S.K., Ganesh, N., Barve, J. et Beg, A.M. (2010). Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine, 6*(1), 179-190.

Jane, J.-l., Robyt, J.F. et Huang, D.-H. (1985). 13C-n.m.r. study of the conformation of helical complexes of amylodextrin and of amylose in solution. *Carbohyd Res, 140*(1), 21-35.

Jane, J.-l., Wong, K.-s. et McPherson, A.E. (1997). Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrins. *Carbohyd Res, 300*(3), 219-227.

Jeon, J.S., Ryoo, N., Hahn, T.R., Walia, H. et Nakamura, Y. (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem, 48*(6), 383-392.

Jeon, S., Kwon, S.Y., Cena, R., Lee, J.-h., Cho, K.-O., Min, J.-J. et Choi, J. (2014). Ultrasound, CT and FDG PET-CT of a Duodenal Granuloma in a Dog. *J Vet Med Sci, 76*(7), 1073-1077.

Ju, C., Wang, Y., Ye, J. et Huang, Y. (2008). Modified-starch consolidation of alumina ceramics. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 23*(4), 558-561.

Judat, B. et Kind, M. (2004). Morphology and internal structure of barium sulfate—derivation of a new growth mechanism. *J Colloid Interf Sci, 269*(2), 341-353.

K. Purushotham Rao, B.P., Ashok Kumar, Azeemuddin Khan, S. S. Biradar, S. Patil Srishail, and B. Satyanath. (2003). Formulation and roentgenographic studies of naproxen-pectin-based matrix tablets for colon drug delivery. *Yale J Biol Med., 76.*

Kapil, R., Dhawan, S., Singh, B., Garg, B. et Singh, B. (2012). Systematic formulation development of once-a-day gastroretentive controlled release tablets of rivastigmine using optimized polymer blends. *J Drug Deliv Sci Tec, 22*(6), 511-521.

Kararli, T.T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos, 16*(5), 351-380.

Khlestkin, V.K., Peltek, S.E. et Kolchanov, N.A. (2018). Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. *Carbohydr Polym, 181*, 460-476.

Kim, S.C., Choi, J.R. et Jeon, B.K. (2016). Physical analysis of the shielding capacity for a lightweight apron designed for shielding low intensity scattering X-rays. *Sci Rep, 6*, 27721.

Kohli, M.D. et Maglinte, D.D. (2009). CT enteroclysis in small bowel Crohn's disease. *Eur J Radiol, 69*(3), 398-403.

Kshirsagar, S.J., Bhalekar, M.R. et Umap, R.R. (2011). Design, development and in vitro-in vivo study of a colon-specific fast disintegrating tablet. *Pharm Dev Technol, 16*(5), 449-456.

Lane, M.D. (2007). Mid-infrared emission spectroscopy of sulfate and sulfate-bearing minerals. *Am Mineral, 92*(1), 1-18.

Larionova, N. (1999). Biodegradable cross-linked starch/protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein administration. *International Journal of Pharmaceutics, 189*(2), 171-178.

Lazik, W., Heinze, T., Pfeiffer, K., Albrecht, G. et Mischnick, P. (2002). Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation. *J Appl Polym Sci, 86*(3), 743-752.

Le Tien, C. et Mateescu, M.A. (2017). Two release rates from monolithic carboxymethyl starch tablets: formulation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. *Drug Deliv Transl Res, 7*(4), 516-528.

Lemieux, M., Gosselin, P. et Mateescu, M.A. (2009). Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: mechanistic study and the influence of degree of substitution. *Int J Pharm, 382*(1-2), 172-182.

Lemieux, M., Gosselin, P. et Mateescu, M.A. (2010). Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch. *AAPS PharmSciTech, 11*(2), 775-785.

Lenaerts, V., Dumoulin, Y. et Mateescu, M.A. (1991). Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J Control Release, 15*(1), 39-46.

Lenaerts, V., Moussa, I., Dumoulin, Y., Mebsout, F., Chouinard, F., Szabo, P., . . . Marchessault, R. (1998). Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *J Control Release, 53*(1-3), 225-234.

Leschka, S., Alkadhi, H., Wildermuth, S. et Marincek, B. (2005). Multi-detector computed tomography of acute abdomen. *Eur Radiol, 15*(12), 2435-2447.

Li, M. et Mann, S. (2000). Emergence of Morphological Complexity in BaSO4Fibers Synthesized in AOT Microemulsions. *Langmuir, 16*(17), 7088-7094.

Liu, F. et Basit, A.W. (2010). A paradigm shift in enteric coating: achieving rapid release in the proximal small intestine of man. *J Control Release, 147*(2), 242-245.

Liu, G., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L. et Li, C. (2017). Structure, functionality and applications of debranched starch: A review. *Trends Food Sci Technol, 63*, 70-79.

Liu, J., Chen, J., Dong, N., Ming, J. et Zhao, G. (2012). Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chem, 132*(4), 2224-2230.

Lyra, M. et Ploussi, A. (2011). Filtering in SPECT Image Reconstruction. *Int J Biomed Imaging, 2011*, 693-795.

Malumba, P., Doran, L., Zanmenou, W., Odjo, S., Katanga, J., Blecker, C. et Bera, F. (2017). Morphological, structural and functional properties of starch granules extracted from the tubers and seeds of Sphenostylis stenocarpa. *Carbohyd Polym, 178*, 286-294.

Mansuri, S., Kesharwani, P., Tekade, R.K. et Jain, N.K. (2016). Lyophilized mucoadhesive-dendrimer enclosed matrix tablet for extended oral delivery of albendazole. *Eur J Pharm Biopharm, 102*, 202-213.

Martínez de Arenaza, I., Sadaba, N., Larrañaga, A., Zuza, E. et Sarasua, J.R. (2015). High toughness biodegradable radiopaque composites based on polylactide and barium sulphate. *Eur Polym J, 73*, 88-93.

Massicotte, L.P., Baille, W.E. et Mateescu, M.A. (2008). Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients. Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. *Int J Pharm, 356*(1-2), 212-223.

Mateescu, M.A., Lenaerts, V. et Dumoulin, Y. (1995). *Use of cross-linked amylose as a matrix for the slow release of biologically active compounds*. US Patent no. 5,456,921.

McConnell, E.L., Short, M.D. et Basit, A.W. (2008). An in vivo comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *J Control Release, 130*(2), 154-160.

Mentzel, H.J., Reinsch, S., Kurzai, M. et Stenzel, M. (2014). Magnetic resonance imaging in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol, 20*(5), 1180-1191.

Minaev, K.M., Martynova, D.O., Zakharov, A.S., Sagitov, R.R., Ber, A.A. et Ulyanova, O.S. (2016). Synthesis of Carboxymethyl Starch for increasing drilling mud quality in drilling oil and gas wells. *IOP C Ser Earth Env, 43*, 012071.

Misman, M.A., Azura, A.R. et Hamid, Z.A.A. (2015). Physico-chemical properties of solvent based etherification of sago starch. *Ind Crop Prod, 65*, 397-405.

Miyake, M., Minato, I., Morikawa, H. et Iwai, S. (1978). Crystal structures and sulphate force constants ofbarite, celestite, and anglesit. *Am Mineral, 63*, 506-510.

Momin, M. et Pundarikakshudu, K. (2005). Optimization and pharmacotechnical evaluation of compression-coated colon-specific drug delivery system of triphala using factorial design. *Drug Develop Res, 65*(1), 34-42.

Mostafa, K.M. et Morsy, M.S. (2004). Tailoring a New Sizing Agent via Structural Modification of Pregelled Starch Molecules Part 1: Carboxymethylation and Grafting. *Starch - Stärke, 56*(6), 254-261.

Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V. et Mateescu, M.A. (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *J Control Release, 76*(1), 51-58.

Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M.A. (2004). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study. *Int J Pharm, 278*(2), 231-238.

Mulhbacher, J. et Mateescu, M.A. (2005). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release III. Diffusion properties. *Int J Pharm, 297*(1-2), 22-29.

Nappinnai, M. et Sivaneswari, S. (2013). Formulation optimization and characterization of gastroretentive cefpodoxime proxetil mucoadhesive microspheres using 32 factorial design. *Journal of Pharmacy Research, 7*(4), 304-309.

O'Connor, S.D. et Summers, R.M. (2007). Revisiting oral barium sulfate contrast agents. *Acad Radiol, 14*(1), 72-80.

O'Brien, S., Wang, Y.-J., Vervaet, C. et Remon, J.P. (2009). Starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydr Polym, 76*(4), 557-566.

Okabe, H., Suzuki, E., Sugiura, Y., Yanagimoto, K., Takanashi, Y., Hoshi, M., . . . Saitoh, E. (2008). Development of an easily swallowed film formulation. *Int J Pharm, 355*(1-2), 62-66.

Oostergetel, G.T. et van Bruggen, E.F.J. (1993). The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohyd Polym, 21*(1), 7-12.

Pachuau, L. et Mazumder, B. (2013). Evaluation of Albizia procera gum as compression coating material for colonic delivery of budesonide. *Int J Biol Macromol, 61*, 333-339.

Pant, B.R., Jeon, H.-J., Park, C.-I., Lee, B.C., Park, J.H. et Song, H.H. (2010). Radiation-Modified Carboxymethyl Starch Derivative as Metal Scavenger in Aqueous Solutions. *Starch - Stärke, 62*(1), 11-17.

Parr, A., Beihn, R.M. et Jay, M. (1986). Radiolabeling of an enteric coated tablet by (n,γ) radioactivation of erbium-170 for scintigraphic imaging. *Int J Pharm, 32*(2-3), 251-256.

Patel, M.M. et Amin, A.F. (2011). Design and optimization of colon-targeted system of theophylline for chronotherapy of nocturnal asthma. *J Pharm Sci, 100*(5), 1760-1772.

Patel, M.M. et Amin, A.F. (2011). Process, optimization and characterization of mebeverine hydrochloride loaded guar gum microspheres for irritable bowel syndrome. *Carbohydrate Polymers, 86*(2), 536-545.

Pendekal, M.S. et Tegginamat, P.K. (2013). Hybrid drug delivery system for oropharyngeal, cervical and colorectal cancer - in vitro and in vivo evaluation. *Saudi Pharm J, 21*(2), 177-186.

Perkins, A.C., Blackshaw, P.E., Hay, P.D., Lawes, S.C., Atherton, C.T., Dansereau, R.J., . . . Spiller, R.C. (2008). Esophageal transit and in vivo disintegration of branded risedronate sodium tablets and two generic formulations of

alendronic acid tablets: a single-center, single-blind, six-period crossover study in healthy female subjects. *Clin Ther, 30*(5), 834-844.

Perkins, A.C., Wilson, C.G., Frier, M., Blackshaw, P.E., Dansereau, R.J., Vincent, R.M., . . . Spiller, R.C. (2001). The use of scintigraphy to demonstrate the rapid esophageal transit of the oval film-coated placebo risedronate tablet compared to a round uncoated placebo tablet when administered with minimal volumes of water. *Int J Pharm, 222*(2), 295-303.

Perkins, A.C., Wilson, C.G., Frier, M., Vincent, R.M., Blackshaw, P.E., Dansereau, R.J., . . . Spiller, R.C. (1999). Esophageal transit of risedronate cellulose-coated tablet and gelatin capsule formulations. *Int J Pharm, 186*(2), 169-175.

Piper, D. (2012, 27 novembre 2017). Case of the Week: Sequoia. [Blog]. Récupéré de http://verandahpethospital.blogspot.ca/2012/

Piron, E. et Domard, A. (1998). Formation of a ternary complex between chitosan and ion pairs of strontium carbonate. *International Journal of Biological Macromolecules, 23*(2), 113-120.

Pislar, M., Brelih, H., Mrhar, A. et Bogataj, M. (2015). Analysis of small intestinal transit and colon arrival times of non-disintegrating tablets administered in the fasted state. *Eur J Pharm Sci, 75*, 131-141.

Pogue, B.W. (2015). Optics in the Molecular Imaging Race. *Opt Photonics News, 26*(9), 24.

Pund, S., Joshi, A., Vasu, K., Nivsarkar, M. et Shishoo, C. (2011). Gastroretentive delivery of rifampicin: in vitro mucoadhesion and in vivo gamma scintigraphy. *Int J Pharm, 411*(1-2), 106-112.

Qi, L., Ma, J., Cheng, H. et Zhao, Z. (1996). Preparation of BaSO4 nanoparticles in non-ionic w/o microemulsions. *Colloid Surface A, 108*(1), 117-126.

Quaia, E. (2013). Contrast-enhanced ultrasound of the small bowel in Crohn's disease. *Abdom Imaging, 38*(5), 1005-1013.

Ragheb, A.A., El-Sayiad, H.S. et Hebeish, A. (1997). Preparation and Characterization of Carboxymethyl Starch (CMS) Products and Their Utilization in Textile Printing. *Starch - Stärke, 49*(6), 238-245.

Raman, V., MacGlaflin, C.E., Moodie, K.L., Kaiser, L.R. et Erkmen, C.P. (2015). Warming barium sulfate improves esophageal leak detection in pig model. *J Surg Res, 199*(2), 657-663.

Rao, G.K., Mandapalli, P.K., Manthri, R. et Reddy, V.P. (2013). Development and in vivo evaluation of gastroretentive delivery systems for cefuroxime axetil. *Saudi Pharm J, 21*(1), 53-59.

Ravenelle, F. et Rahmouni, M. (2006). Contramid© : High –Amylose Starch for Controlled Drug Delivery. Dans Marchessault R, Ravenelle F et X.X., Z. (dir.), *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. (1st edn)* : ACS symposium series. Washington DC. USA. 79-104.

Retamal Marín, R.R., Babick, F. et Hillemann, L. (2017). Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. *Colloid Surface A, 532*, 516-521.

Rex, D.K., Rahmani, E.Y., Haseman, J.H., Lemmel, G.T., Kaster, S. et Buckley, J.S. (1997). Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. *Gastroenterology, 112*(1), 17-23.

Rocha, B.S., Lundberg, J.O., Radi, R. et Laranjinha, J. (2016). Role of nitrite, urate and pepsin in the gastroprotective effects of saliva. *Redox Biol, 8*, 407-414.

Rockey, D.C., Paulson, E., Niedzwiecki, D., Davis, W., Bosworth, H.B., Sanders, L., . . . Halvorsen, R. (2005). Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison. *The Lancet, 365*(9456), 305-311.

Rollandi, G.A., Biscaldi, E. et DeCicco, E. (2007). Double contrast barium enema: technique, indications, results and limitations of a conventional imaging methodology in the MDCT virtual endoscopy era. *Eur J Radiol, 61*(3), 382-387.

Root, C.R. et Morgan, J.P. (1969). Contrast Radiography of the Upper Gastrointestinal Tract in the Dog: A Comparison of Micropulverized Barium Sulfate and U.S.P. Barium Sulfate Suspensions in Clinically Normal Dogs. *J Small Anim Pract, 10*(5), 279-286.

Rosman, A.S. et Korsten, M.A. (2007). Meta-analysis comparing CT colonography, air contrast barium enema, and colonoscopy. *Am J Med, 120*(3), 203-210 e204.

Sagawa, K., Li, F., Liese, R. et Sutton, S.C. (2009). Fed and fasted gastric pH and gastric residence time in conscious beagle dogs. *J Pharm Sci, 98*(7), 2494-2500.

Saikia, C., Das, M.K., Ramteke, A. et Maji, T.K. (2016). Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. *Int J Biol Macromol, 93*(Pt A), 1121-1132.

Saini, S., Seltzer, S.E., Bramson, R.T., Levine, L.A., Kelly, P., Jordan, P.F., . . . Thrall, J.H. (2000). Technical cost of radiologic examinations: analysis across imaging modalities. *Radiology, 216*(1), 269-272.

Sakkinen, M., Marvola, J., Kanerva, H., Lindevall, K., Ahonen, A. et Marvola, M. (2006). Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine? An evaluation based on gamma scintigraphy. *Int J Pharm, 307*(2), 285-291.

Sangseethong, K., Chatakanonda, P., Wansuksri, R. et Sriroth, K. (2015). Influence of reaction parameters on carboxymethylation of rice starches with varying amylose contents. *Carbohydr Polym, 115*, 186-192.

Saphier, S., Rosner, A., Brandeis, R. et Karton, Y. (2010). Gastro intestinal tracking and gastric emptying of solid dosage forms in rats using X-ray imaging. *Int J Pharm, 388*(1-2), 190-195.

Schrodt, A. (1942). *Process for the preparation of starch derivatives*. [Octroi]. DE717275 C.

Senthil, V., Gopalakrishnan, S., Sureshkumar, R., Jawahar, N., Ganesh, G.N. et Nagasamyvenkatesh, D. (2010). Mucoadhesive slow-release tablets of theophylline: Design and evaluation. *Asian J Pharm, 4*(1), 64.

Sharma, B.G., Kumar, N., Nishad, D.K., Khare, N.K. et Bhatnagar, A. (2016). Development of microbial trigger based oral formulation of Tinidazole and its Gamma Scintigraphy Evaluation: A promising tool against anaerobic microbes associated GI problems. *Eur J Pharm Sci, 89*, 94-104.

Sharma, V.K. et Mazumder, B. (2014). Gastrointestinal transition and anti-diabetic effect of Isabgol husk microparticles containing gliclazide. *Int J Biol Macromol, 66*, 15-25.

Shibata, N., Nishumura, A., Naruhashi, K., Nakao, Y. et Miura, R. (2010). Preparation and pharmaceutical evaluation of new sustained-release capsule including starch-sponge matrix (SSM). *Biomed Pharmacother, 64*(5), 352-358.

Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., Brant, S.R., . . . Warren, B.F. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol, 19 Suppl A*(19 Suppl A), 5A-36A.

Singh, K., Suri, R., Tiwary, A.K. et Rana, V. (2013). Exploiting the synergistic effect of chitosan-EDTA conjugate with MSA for the early recovery from colitis. *Int J Biol Macromol, 54*, 186-196.

Sinha, S.R., Nguyen, L.P., Inayathullah, M., Malkovskiy, A., Habte, F., Rajadas, J. et Habtezion, A. (2015). A Thermo-Sensitive Delivery Platform for Topical Administration of Inflammatory Bowel Disease Therapies. *Gastroenterology, 149*(1), 52-55 e52.

Sistrom, C.L. et McKay, N.L. (2005). Costs, charges, and revenues for hospital diagnostic imaging procedures: differences by modality and hospital characteristics. *J Am Coll Radiol, 2*(6), 511-519.

Sloan, J.W., Mehltretter, C.L. et Senti, F.R. (1962). Carboxymethyl High-Amylose Starch. *J Chem Eng Data, 7*(1), 156-158.

Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Saunders, J., Remon, J.P., . . . Goddeeris, B.M. (2004). Gastrointestinal transit time of nondisintegrating radio-opaque pellets in suckling and recently weaned piglets. *J Control Release, 94*(1), 143-153.

Soares, G.A., de Castro, A.D., Cury, B.S. et Evangelista, R.C. (2013). Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. *Carbohydr Polym, 91*(1), 135-142.

Spinella, G., Cinti, F., Pietra, M., Capitani, O. et Valentini, S. (2014). A case report of percutaneous endoscopic gastrostomy left-side gastropexy to resolve a recurrent gastric dilatation in a dog previously treated with right-side gastropexy for gastric dilatation volvulus. *Top Companion Anim Med, 29*(4), 113-116.

Spychaj, T., Wilpiszewska, K. et Zdanowicz, M. (2013). Medium and high substituted carboxymethyl starch: Synthesis, characterization and application. *Starch - Stärke, 65*(1-2), 22-33.

Srivastava, R., Kumar, D. et Pathak, K. (2012). Colonic luminal surface retention of meloxicam microsponges delivered by erosion based colon-targeted matrix tablet. *Int J Pharm, 427*(2), 153-162.

Stamatopoulos, K., Batchelor, H.K. et Simmons, M.J. (2016). Dissolution profile of theophylline modified release tablets, using a biorelevant Dynamic Colon Model (DCM). *Eur J Pharm Biopharm, 108*, 9-17.

Statistics Canada. (2015). *Décès, selon la cause. Chapitre XI : Maladies de l'appareil digestif* (Tableau 102-0531). Récupéré de Canadian socioeconomic database CANSIM.

Stockis, A., Sargentini-Maier, M.L., Otoul, C., Connor, A., Wilding, I. et Wray, H. (2010). Assessment of levetiracetam bioavailability from targeted sites in the human intestine using remotely activated capsules and gamma scintigraphy: Open-label, single-dose, randomized, four-way crossover study in healthy male volunteers. *Clin Ther, 32*(10), 1813-1821.

Sugihara, H., Matsui, Y., Takeuchi, H., Wilding, I., Connor, A., Abe, K. et Nishiura, A. (2014). Development of a gastric retentive system as a sustained-release formulation of pranlukast hydrate and its subsequent in vivo verification in human studies. *Eur J Pharm Sci, 53*, 62-68.

Sun, Y., Shi, C., Yang, J., Zhong, S., Li, Z., Xu, L., . . . Cui, X. (2018). Fabrication of folic acid decorated reductive-responsive starch-based microcapsules for targeted drug delivery via sonochemical method. *Carbohydrate Polymers*.

Sutton, S.C. (2004). Companion animal physiology and dosage form performance. *Adv Drug Deliv Rev, 56*(10), 1383-1398.

Tadros, M.I. (2010). Controlled-release effervescent floating matrix tablets of ciprofloxacin hydrochloride: development, optimization and in vitro-in vivo evaluation in healthy human volunteers. *Eur J Pharm Biopharm, 74*(2), 332-339.

Tadros, M.I. et Fahmy, R.H. (2014). Controlled-release triple anti-inflammatory therapy based on novel gastroretentive sponges: characterization and magnetic resonance imaging in healthy volunteers. *Int J Pharm, 472*(1-2), 27-39.

Teh, C.Y., Wu, T.Y. et Juan, J.C. (2014). Potential use of rice starch in coagulation–flocculation process of agro-industrial wastewater: Treatment performance and flocs characterization. *Ecol Eng, 71*, 509-519.

Tester, R.F., Karkalas, J. et Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci, 39*(2), 151-165.

Thombre, A.G., Shamblin, S.L., Malhotra, B.K., Connor, A.L., Wilding, I.R. et Caldwell, W.B. (2015). Pharmacoscintigraphy studies to assess the feasibility of a controlled release formulation of ziprasidone. *J Control Release, 213*, 10-17.

Tsunashima, D., Kawamura, A., Murakami, M., Sawamoto, T., Undre, N., Brown, M., . . . First, R. (2014). Assessment of tacrolimus absorption from the human intestinal tract: open-label, randomized, 4-way crossover study. *Clin Ther, 36*(5), 748-759.

Tugcu-Demiroz, F., Acarturk, F., Takka, S. et Konus-Boyunaga, O. (2004). In-vitro and in-vivo evaluation of mesalazine-guar gum matrix tablets for colonic drug delivery. *J Drug Target, 12*(2), 105-112.

Tugcu-Demiroz, F., Acarturk, F., Takka, S. et Konus-Boyunaga, O. (2007). Evaluation of alginate based mesalazine tablets for intestinal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm, 67*(2), 491-497.

Tung, N.-T., Pham, T.-M.-H., Nguyen, T.-H., Pham, T.-T. et Nguyen, T.-Q. (2016). Pectin/HPMC dry powder coating formulations for colon specific targeting tablets of metronidazole. *J Drug Deliv Sci Tec, 33*, 19-27.

Tusch, M., Kruger, J. et Fels, G. (2011). Structural Stability of V-Amylose Helices in Water-DMSO Mixtures Analyzed by Molecular Dynamics. *J Chem Theory Comput, 7*(9), 2919-2928.

United States Pharmacopeia and National Formulary. (2010). *USP 29-NF 24* : Pharmacopeia.cn. Récupéré de http://www.pharmacopeia.cn/

Varum, F.J., Hatton, G.B., Freire, A.C. et Basit, A.W. (2013). A novel coating concept for ileo-colonic drug targeting: proof of concept in humans using scintigraphy. *Eur J Pharm Biopharm, 84*(3), 573-577.

Vora, P. et Chapman, A. (2004). Complications from radiographer-performed double contrast barium enemas. *Clin Radiol, 59*(4), 364-368.

Vueba, M.L., Rodrigues, A., Lourenco, P., Batista de Carvalho, L.A., Veiga, F., Sousa, J.J. et Pina, M.E. (2013). Gamma scintigraphy in the analysis of ketoprofen behaviour from matrix tablets. *Int J Pharm, 448*(1), 298-304.

Wang, X., Feng, W., Wang, W., Wang, W., Zhao, L. et Li, Y. (2017). Sodium carboxymethyl starch-based highly conductive gel electrolyte for quasi-solid-state quantum dot-sensitized solar cells. *Research on Chemical Intermediates, 44*(2), 1161–1172.

Wilson, C.G., O'Mahony, B., Connolly, S.M., Cantarini, M.V., Farmer, M.R., Dickinson, P.A., . . . Swaisland, H.C. (2009). Do gastrointestinal transit parameters influence the pharmacokinetics of gefitinib? *Int J Pharm, 376*(1-2), 7-12.

Wojtasz, J., Carlstedt, J., Fyhr, P. et Kocherbitov, V. (2016). Hydration and swelling of amorphous cross-linked starch microspheres. *Carbohydr Polym, 135*, 225-233.

Womack, C. (1984). Unusual histological appearances of barium sulphate--a case report with scanning electron microscopy and energy dispersive x ray analysis. *J Clin Pathol, 37*(5), 488-493.

Wu, H., Liu, Z., Yang, H. et Li, A. (2016). Evaluation of chain architectures and charge properties of various starch-based flocculants for flocculation of humic acid from water. *Water Res, 96*, 126-135.

Wu, W., Chen, T., Du, H., Li, D. et Liu, J. (2016). Carboxymethyl starch as corrosion inhibitor for mild steel. *Emerging Materials Research, 5*(2), 277-283.

Yang, J.M., Li, C., Chen, R., Rao, B., Yao, J., Yeh, C.H., . . . Wang, L.V. (2015). Optical-resolution photoacoustic endomicroscopy in vivo. *Biomed Opt Express, 6*(3), 918-932.

Yao, H., Yao, H., Zhu, J., Yu, J. et Zhang, L. (2012). Preparation and evaluation of a novel gastric floating alginate/poloxamer inner-porous beads using foam solution. *Int J Pharm, 422*(1-2), 211-219.

Yassin, A.E., Alsarra, I.A., Alanazi, F.K., Al-Mohizea, A.M., Al-Robayan, A.A. et Al-Obeed, O.A. (2010). New targeted-colon delivery system: in vitro and in vivo evaluation using X-ray imaging. *J Drug Target, 18*(1), 59-66.

Yeh, A. et Morowitz, M.J. (2017). Probiotics and fecal microbiota transplantation in surgical disorders. *Semin Colon Rectal Surg, 29*, 37-43.

Yeong, C.H., Blackshaw, P.E., Ng, K.H., Abdullah, B.J., Blaauw, M., Dansereau, R.J. et Perkins, A.C. (2011). Reproducibility of neutron activated Sm-153 oral dose formulations intended for human administration. *Appl Radiat Isot, 69*(9), 1181-1184.

Yuan, J., Liu, T., Li, H., Shi, T., Xu, J., Liu, H., . . . Li, S. (2014). Oral sustained-release suspension based on a novel taste-masked and mucoadhesive carrier-ion-exchange fiber. *Int J Pharm, 472*(1-2), 74-81.

Zając, A., Hanuza, J., Wandas, M. et Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A, 134*, 114-120.

Zakeri, N. et Pollok, R.C. (2016). Diagnostic imaging and radiation exposure in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol, 22*(7), 2165-2178.

Zhang, C., Tang, J., Liu, D., Li, X., Cheng, L. et Tang, X. (2016). Design and evaluation of an innovative floating and bioadhesive multiparticulate drug delivery system based on hollow structure. *Int J Pharm, 503*(1-2), 41-55.

Zhang, C., Xu, M., Tao, X., Tang, J., Liu, Z., Zhang, Y., . . . Tang, X. (2012). A floating multiparticulate system for ofloxacin based on a multilayer structure: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm, 430*(1-2), 141-150.

(dir.). (2003). *Progress in the synthesis and application of green chemicals, carboxymethyl starch sodium.* Proc 3rd Int Conf Funct Mol. Dalian, China.

Zhang, L., Yang, Y., Zhang, J., Zhou, X., Dong, H. et Zhou, Y. (2015). Barium sulfate aspiration: Severe chemical pneumonia induced by a massive reflux of contrast medium during small bowel barium enema. *Forensic Sci Int, 253*, e16-19.

Zhang, Y. et Lixia, L. (2014). Reaction mechanism of carboxymethyl starch-based wood adhesive. *Comput. Model. New Technol, 18*, 1150.

Zhao, Q., Gao, B., Ma, L., Lian, J., Deng, L. et Chen, J. (2015). Innovative intragastric ascaridole floating tablets: Development, optimization, and in vitro-in vivo evaluation. *Int J Pharm, 496*(2), 432-439.

Zhu, F. (2017). Plasma modification of starch. *Food Chem, 232*, 476-486.

Zhu, F. (2018). Modifications of starch by electric field based techniques. *Trends in Food Science & Technology, 75*, 158-169.

Zou, H., Jiang, X., Kong, L. et Gao, S. (2008). Design and evaluation of a dry coated drug delivery system with floating-pulsatile release. *J Pharm Sci, 97*(1), 263-273.