

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FORMULATION DE PROTÉINES VÉGÉTALES POUR  
ADMINISTRATION ORALE AVEC DES MATRICES À BASE DE  
CARBOXYMÉTHYLAMIDON CONTENANT  
DES INHIBITEURS DE PROTÉASES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
PATRICK DE KONINCK

NOVEMBRE 2009

# 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.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°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

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Professeur Mircea Alexandru Mateescu pour son accueil chaleureux dans son laboratoire, et pour son support tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également mon co-directeur, le professeur Denis Archambault, pour sa confiance concernant le projet auquel j'ai pu contribuer ainsi que son encadrement scientifique.

Je remercie tous mes collègues du Laboratoire d'Enzymologie et des Polymères Bio-compatibles pour leurs encouragements et leurs judicieux conseils. Je remercie également mes collègues des Laboratoires de Biologie Moléculaire et de Biologie Végétale pour leur aide et leur soutien.

Je remercie les professeurs Sylvain Canesi et Martin Lessard qui ont accepté d'être lecteurs pour l'évaluation de ce mémoire

Je tiens à remercier le CRSNG programme stratégique et le CRIP pour les financements octroyés durant la réalisation de ce projet.

## Table des matières

<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Contributions à la recherche réalisées au cours de la maîtrise</b> .....	<b>xi</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>xiii</b>
<b>PARTIE I - INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : LE PRINCIPE DE LA VACCINATION ET DE L'IMMUNITÉ MUCOSALE</b> .....	<b>2</b>
1.1 La vaccination .....	2
1.2 Le principe de la vaccination .....	3
1.2.1 La réponse a médiation cellulaire .....	4
1.2.2 La réponse humorale .....	5
1.2.3 La réponse vaccinale .....	7
1.3 Classification des vaccins .....	8
1.3.1 Les vaccins issus d'agents infectieux atténués .....	8
1.3.2 Les vaccins issus d'agents infectieux inactivés ou tués .....	8
1.3.3 Les vaccins constitués de sous-unités d'agents infectieux .....	9
1.3.4 Les vaccins constitués de toxines inactivées .....	9
1.4 Les modes de vaccination .....	10
1.4.1 La vaccination par voie orale .....	10
1.4.2 L'immunité mucosale .....	11
<b>CHAPITRE II : EXPRESSION D'ANTIGÈNES PAR DES PLANTES TRANSGÉNIQUES</b> .....	<b>15</b>
2.1 Aspects généraux .....	15
2.2 Les vaccins mucosaux à base de plantes transformées .....	16
2.3 La luzerne, candidate de choix en moléculture .....	17

2.4 Transformation de plantes .....	19
2.4.1 Obtention de plantes transgéniques .....	19
2.4.2 Technique d'agro-infiltration .....	21
2.5 Taux d'expression de protéines exogènes .....	22
2.5.1 Exemples de molécules exprimées .....	22
2.5.2 Vaccins .....	23
2.5.3 Anticorps recombinants .....	23

### **CHAPITRE III : L'AMIDON ET SES DÉRIVÉS DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE .....**

<b>3.1 L'amidon .....</b>	<b>24</b>
3.1.1 Structure de l'amylose .....	25
3.1.2 Structure de l'amylopectine .....	26
3.1.3 Les éléments non glucidiques de l'amidon .....	28
3.1.4 La structure granulaire .....	29
3.1.5 L'organisation spatiale de l'amylose et de l'amylopectine .....	31
3.1.6 Les complexes de l'amylose .....	33
3.2 Propriétés physicochimiques de l'amidon .....	34
3.2.1 La solubilité .....	34
3.2.2 La gélatinisation .....	34
3.2.3 La gélification .....	35
3.2.4 La rétrogradation .....	35
3.3 Les amidons modifiés .....	37
3.3.1 Traitements physiques .....	37
3.3.2 Traitement enzymatique .....	37
3.3.3 Traitements chimiques .....	38
3.4 Applications industrielles de l'amidon .....	40
3.5 Formulation pharmaceutiques à base d'amidon .....	42
3.5.1 Administration orale d'agents pharmaceutiques .....	42
3.5.2 Formes galéniques .....	44
3.5.2.1 Formes galéniques simples .....	44
3.5.2.2 Formes à libération accélérée .....	45
3.5.2.3 Formes à libération différée .....	46
3.5.2.4 Formes à libération contrôlée ou prolongée .....	47

3.5.2.5 Les polymères dans les systèmes à libération contrôlée	48
3.5.3 L'amidon et ses dérivés dans la composition des comprimés ....	49
3.5.3.1 Agents liants .....	49
3.5.3.2 Agents désintégrant	50
3.5.4.3 Agents diluants .....	51
3.5.4.4 L'amidon riche en amylose réticulé .....	51
3.5.4.5 L'amidon réticulé pour la libération contrôlée enzymatiquement .....	53
3.5.4.6 L'amidon réticulé et substitué .....	54
3.5.4.7 Le carboxyméthyl amidon comme excipient pharmaceutique .....	54
<b>CHAPITRE IV : PRÉSENTATION DU PROJET</b> .....	<b>56</b>
<b>PARTIE II - PARTIE EXPÉRIMENTALE</b> .....	<b>59</b>
<b>CHAPITRE V : MANUSCRIT</b> .....	<b>60</b>
Carboxymethyl-Starch excipients for gastrointestinal stable oral protein formulations containing protease inhibitors .....	62
<b>CHAPITRE VI : DISCUSSION ET CONCLUSIONS</b> .....	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>97</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>120</b>

## Liste des figures

### Partie Introductive

Figure 1.1 :	Interactions cellulaires impliquées dans l'induction des réponses immunitaires (d'après Goldsby et al., 2000). .....	4
Figure 1.2 :	Coupe schématique de la muqueuse bordant l'intestin montrant un nodule de follicule lymphoïde qui constitue une plaque de Peyer dans la sous-muqueuse. (d'après Goldsby et al., 2000). .....	12
Figure 1.3 :	(a) Représentation d'une cellule M contenue dans la muqueuse intestinale. (b) Mécanisme de production d'IgA au niveau des sites inductifs. (d'après Goldsby et al., 2000). .....	13
Figure 2.1 :	Schématisation de l'obtention d'une plante transgénique par utilisation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (d'après Tzfira et Citovsky, 2006). .....	19
Figure 2.2 :	Schématisation du transfert d'un gène d'intérêt provenant d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dans le génome de la plante (d'après Tzfira et Citovsky, 2006). .....	21
Figure 3.1 :	Représentation schématique de l'amylose. ....	25
Figure 3.2 :	Représentation schématique de l'amylopectine. ....	26
Figure 3.3 :	Modèles proposés pour la structure de l'amylopectine. (1) Modèle de Haworth (2) Modèle de Staudinger (3) Modèle de Meyer et Bernfeld (d'après Buléon et al., 1998). .....	27
Figure 3.4 :	Représentation des différents niveaux d'organisation au sein d'un grain d'amidon (d'après Jenkins et Donald, 1995). ....	30
Figure 3.5 :	Conformations hélicoïdales présentes dans l'amidon et ses dérivés : (A) Simple hélice d'amylose (B) Double hélice d'amylose (C) Double hélice formée par deux chaînes courtes d'amylopectine (d'après Buléon et al., 1998). .....	31
Figure 3.6 :	Représentations schématiques des structures cristallines de l'amylose de type A et de type B (d'après Buléon et al., 1998). ...	32

Figure 3.7 :	Représentation schématique du complexe formé par la chaîne aliphatique d'un acide gras emprisonné dans la cavité hydrophobe d'une hélice d'amylose (d'après Buléon et al., 1998). .....	33
Figure 3.8 :	Courbe de viscosité de Brabender (Leach, 1984). .....	36
Figure 3.9 :	Représentation schématique de la réaction de réticulation de l'amidon par l'épichlorhydrine. ....	39
Figure 3.10 :	Représentation schématique de la réaction de substitution de l'amidon par l'acide monochloroacétique. ....	40
Figure 3.11 :	L'effet de premier passage aux niveaux intestinal et hépatique (d'après Rowland et Towzer, 1980). ....	43
Figure 3.12 :	Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration de comprimés de forme galénique simple sans contrôle de la libération. ....	45
Figure 3.13 :	Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération accélérée. ....	46
Figure 3.14 :	Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération différée. ....	47
Figure 3.15 :	Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération contrôlée. ....	48
Figure 3.16 :	Influence du degré de réticulation de l'amidon riche en amylose sur (a) le temps de libération du principe actif (b) le profil de diffraction aux rayons X (d'après (a) Dumoulin et al., 1998; (b) Ispas-Szabo et al., 2000). ....	52
Figure 3.17 :	Représentation hypothétique de la stabilisation par ponts hydrogènes de l'amidon riche en amylose (a) faiblement réticulé (b) hautement réticulé (Dumoulin et al., 1998). ....	53

**Partie Expérimentale**

Figure 1 :	Stability of proteins in simulated gastric fluid (SGF). .....	84
Figure 2 :	Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF). .....	85
Figure 3 :	Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF) with protease inhibitor in dissolution media. ....	86
Figure 4 :	Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF) with protease inhibitor included in formulation. ....	87
Figure 5 :	Stability of proteins in simulated intestinal fluid (SIF) containing pancreatin and protease inhibitor (Pefabloc SC). ....	88
Figure 6 :	Lipase as a marker for protein formulation. ....	89

## Liste des tableaux

### Partie Introductive

- Tableau 1.1 : Comparaison des taux de morbidité pour différentes maladies infectieuses avant et après vaccination systématique chez l'enfant (d'après Ogra et al., 2001). ..... 2
- Tableau 1.2 : Classification de vaccins utilisés contre différents types de maladies infectieuses en fonction de leur méthode d'administration (d'après Nikkels et al., 2000). ..... 10
- Tableau 3.1 : Teneurs en amylose et forme des grains d'amidon provenant de différentes sources botaniques (d'après Duprat et al., 1980). ... 28

### Partie Expérimentale

- Tableau 6.1 : Activité inhibitrice du Pefabloc SC par rapport à celle du PMSF et du DFP pour plusieurs protéases à sérine. .... 94

## Liste des abréviations

APC	Cellule présentatrice d'antigène
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
Cellule Th	Cellule T " <i>helper</i> "
Cellule Tc	Cellule T " <i>cytotoxic</i> "
Cellule NK	Cellule " <i>Natural Killer</i> "
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMA	Carboxyméthyl Amidon
DS	Degré de substitution
DSM	Degré de substitution molaire
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>
MALT	<i>Mucosal-associate lymphoid tissue</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RMN	Raisonnance Magnétique Nucléaire
ScFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SGAPs	<i>Starch granule-associated proteins</i>
SGF	<i>Simulated Gastric Fluid</i>
SIF	<i>Simulated Intestinal Fluid</i>
SICM	Système immunitaire commun aux muqueuses
SN	Substitution nucléophile
TPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>

## **Contributions à la recherche réalisées dans le cadre de la maîtrise**

### **Article avec comité de lecture**

Patrick De Koninck, Denis Archambault, Francine Hamel, Fathey Sarhan, Mircea Alexandru Mateescu - Carboxymethyl-Starch excipients for gastrointestinal stable oral protein formulations containing protease inhibitors. Article soumis pour publication dans: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

### **Conférences avec arbitrage (texte intégral ou abrégé publié)**

Pompilia Ispas-Szabo, Patrick De Koninck, Carmen Calinescu, Mircea Alexandru Mateescu - Novel Carboxymethyl Starch Excipients for Oral Dosage Forms. Transaction of the 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Vienne, 2007, # 724.

### **Participation aux congrès et résumés publiés**

Patrick De Koninck, Pompilia Ispas-Szabo, Carmen Calinescu, Mircea Alexandru Mateescu - Formulation d'agents thérapeutiques de petites masses moléculaires avec matrices à base de carboxyméthyl amidon. 3e Colloque Annuel - BioMed, Montréal, 2007, # 13.

Patrick De Koninck, Denis Archambault, Fathey Sarhan, Mircea Alexandru Mateescu - Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par voie orale. 1er Symposium du Centre de Recherches en Infectiologie Porcine, St-Hyacinthe, 2007, # 66.

Patrick De Koninck, Denis Archambault, Fathey Sarhan, Mircea Alexandru Mateescu - Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par la voie orale. XIe Colloque annuel des étudiants chercheurs en chimie et en biochimie de l'UQÀM, Montréal, 2008, # J-9.

Patrick De Koninck, Denis Archambault, Fathey Sarhan, Mircea Alexandru Mateescu - Formulation de protéines végétales avec matrices à base d'amidon à des fins vaccinales par la voie orale. 4e Colloque Annuel - BioMed, Montréal, 2008, # 11.

Patrick De Koninck, Denis Archambault, Fathey Sarhan, Francine Hamel, Mircea Alexandru Mateescu - Formulation de protéines végétales avec matrice de carboxyméthyl amidon pour le développement de vaccins par voie orale. 4e Colloque international francophone de microbiologie animale & végétale; 2e Symposium du Centre de Recherches en Infectiologie Porcine, St-Hyacinthe, 2008, # D-15.

## Résumé

L'utilisation de l'amidon comme agent de remplissage, agent liant ou agent désagrégeant est très répandue dans l'industrie pharmaceutique. Des modifications chimiques effectuées sur ce polymère auront une influence sur ses propriétés rhéologiques. La carboxyméthylation de l'amidon génère un excipient dont les propriétés de gastro-protection ainsi que de libération contrôlée pour plusieurs catégories de principes bioactifs ont été démontrées lors de différentes études (Calinescu et al., 2005; 2007; Massicotte et al., 2008). Le concept d'immunisation mucoale lors de la vaccination est basé sur le fait que plusieurs pathogènes ont comme porte d'entrée dans l'organisme les muqueuses (par exemple celles du tractus respiratoire ou gastro-intestinal). Dans cette optique, pour contrer ou prévenir une infection, il faut cibler l'induction de l'immunité mucoale au site d'entrée du pathogène afin d'obtenir une protection optimale.

Les protéines végétales incluant des fragments immunogènes spécifiques d'agents infectieux peuvent être utilisées à des fins d'immunisation orale pour une stimulation de l'appareil lymphoïde de la muqueuse intestinale. Une limite à cette approche est la barrière stomacale par rapport au pH gastrique et à l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. Il était important de protéger les protéines immunogènes en incorporant les extraits végétaux dans une matrice polymérique utilisée à des fins de transport jusqu'à la muqueuse intestinale. Pour ce faire, les extraits végétaux lyophilisés ont été formulés avec le carboxyméthyl amidon (CMA) offrant une protection gastrique et une libération ciblée de l'actif au niveau intestinal. Lors de la libération des extraits végétaux dans la solution simulant les conditions intestinales (SIF), une destruction des protéines a été observée. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases a été testée d'une part dans le milieu de libération et d'autre part dans la formulation elle-même. La libération des agents bioactifs non dégradés a été observée avec l'utilisation du Pefabloc SC à une concentration de 1,6 % (w/w) dans la formulation. A cette concentration, une stabilisation des protéines dans le SIF est observée pendant 6 h. L'utilisation de la lipase comme marqueur enzymatique a permis de donner une information sur la conservation de la structure protéique des éléments bioactifs lors de leur libération.

**Mots clés :** vaccination, plantes transgéniques, polymères biocompatibles, amidon, voie orale, gastro protection, libération contrôlée, inhibiteur de protéases.

**PARTIE I**  
**INTRODUCTION**

## CHAPITRE I

### LE PRINCIPE DE LA VACCINATION ET L'IMMUNITÉ MUCOSALE

#### 1.1 La vaccination

De façon générale, la qualité et l'espérance de vie n'ont cessé de s'améliorer lors de la dernière décennie (World Health Report, 1998). L'utilisation de vaccins pour contrer les maladies infectieuses constitue une véritable avancée dans la médecine moderne. On observe une diminution allant de 90 à 100% des cas de mortalité, pour plusieurs maladies infectieuses infantiles depuis l'introduction de vaccins et leur utilisation de façon systématique. La poliomyélite a été éradiquée de l'Europe et de l'Amérique du nord suite à l'administration de vaccins chez les jeunes enfants (Shimizu et Takeda, 2008). De même, pour les 50 dernières années, on observe une diminution de 95 à 100 % du taux de mortalité pour la diphtérie, la coqueluche, le tétanos, l'*Haemophilus influenzae* de type B, la rougeole, les oreillons, la rubéole (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1** : Comparaison des taux de mortalité pour différentes maladies infectieuses avant et après vaccination systématique chez l'enfant (d'après Ogra et al., 2001).

Maladie	Mortalité annuelle maximale (année)	Mortalité en 1998	Diminution (%)
Variole	48164 (1900)	0	100
Diphtérie	175885 (1920)	1	100
Coqueluche	147271 (1922)	6279	95,7
Tétanos	1314 (1922)	34	97,4
Poliomyélite	16316 (1952)	0	100
Rougeole	503282 (1958)	89	99,8
Oreillons	152209 (1968)	606	99,6
Rubéole	47745 (1967)	345	99,3
H. Influenzae type B	20000 (1985)	54	99,7

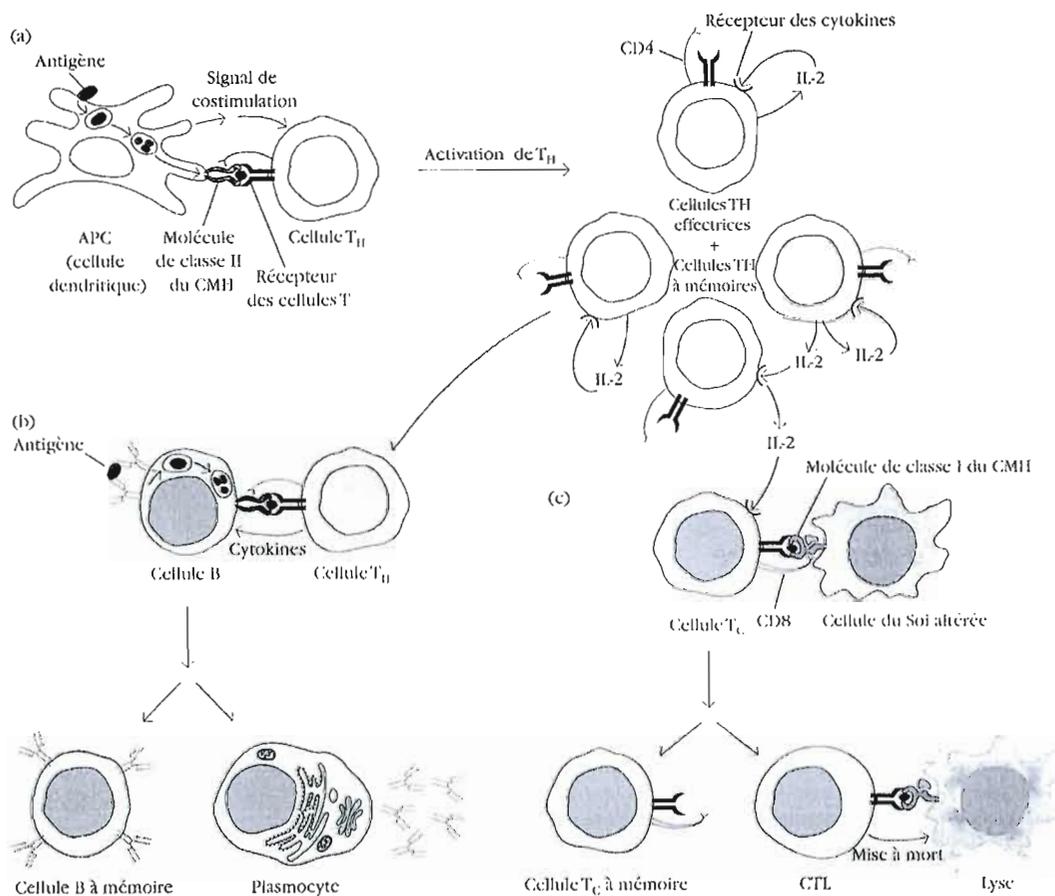
La Société canadienne de pédiatrie et le Comité consultatif national de l'immunisation recommandent la vaccination systématique. Un exemple de vaccin utilisé de façon systématique chez l'enfant âgé de 4 à 6 ans est celui du vaccin à composante antioquelucheuse ou de vaccin acellulaire combiné contre la coqueluche, la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite (vaccin associé DCT-polio) (Weston et Klein, 2008; Taub et al., 2008).

## **1.2 Le principe de la vaccination**

La vaccination est un procédé consistant à introduire une préparation immunogénique dans un organisme vivant afin de créer une réaction immunitaire spécifique contre une maladie infectieuse (Wehlre, 1968). Le principe actif d'un vaccin est un antigène destiné à stimuler le système immunitaire. Dans un contexte d'immunisation active, l'antigène est aussi appelé agent immunogène. La réaction immunitaire générée permet une mise en mémoire de l'antigène présenté pour qu'à l'avenir, lors d'une exposition à un agent infectieux, la réponse immune puisse s'activer de façon plus rapide (Crotty et al., 2003). La réponse immunitaire présente deux aspects: une réponse humorale et une réponse à médiation cellulaire. Ces deux branches requièrent une interaction entre différents types de cellules pour induire une réponse immunitaire spécifique (Fig 1.1).

L'induction des réponses immunitaires humorale et à médiation cellulaire dépend de l'activation des cellules T "helper" (Th) (MacLennan, 1994). À la suite de l'apprêtement de l'antigène par les cellules dendritiques, les cellules Th se lient aux complexes peptide-molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des ces cellules présentatrices de l'antigène. Cette interaction provoque un signal qui conduit à l'activation et à la prolifération des cellules Th (Datta et al., 2004). La population de cellules Th spécifiques de l'antigène, développée de façon

clonale, joue un rôle dans l'activation des lymphocytes B et de lymphocytes T qui créent les réponses humorale et à médiation cellulaire (Fig 1.1).



**Figure 1.1:** Interaction cellulaires impliquées dans l'induction des réponses immunitaires (APC : cellules présentatrice d'antigène). L'activation et la prolifération des cellules Th (a), lors d'une immunisation thymo-dépendante, sont nécessaires au déclenchement d'une réponse humorale (b) et d'une réponse à médiation cellulaire contre des cellules de l'organisme altérées (c) (d'après Goldsby et al., 2000).

### 1.2.1 La réponse à médiation cellulaire

La réponse à médiation cellulaire est associée à différentes sous-populations de lymphocytes T et, comme dans la réponse humorale, une population de cellules Th

activées par un antigène spécifique est nécessaire. Après activation et différenciation clonale des cellules Th, des cytokines sont secrétées par ces cellules Th CD4+ (Stephens et al., 2006). Ces cytokines contribuent à l'activation des cellules Th effectrices responsables de la réponse à médiation cellulaire et à la création de cellules Th à mémoire. L'interleukine 2 (IL-2), secrétée par les cellules Th CD4+, stimule la prolifération et la différenciation des cellules T "cytotoxique" (Tc) CD8+. Après liaison à un antigène apprêté combiné à des molécules de classe I du CMH à la surface de la membrane d'une cellule du Soi altérée, l'activation des lymphocytes Tc CD8+ engendre des dommages membranaires chez la cellule du Soi altérée avec pour résultat une lyse cellulaire (Fig 1.1). Une sous-population de lymphocytes Tc se différencie en cellules Tc à mémoire (Wood et al., 2007).

### **1.2.2 La réponse humorale**

De façon générale, les vaccins stimulent la production d'anticorps (ou immunoglobulines (Ig)). La mesure du titre d'anticorps générés après vaccination est représentative du taux d'immunisation induite par le vaccin administré (Odinsen et al., 2007). Les anticorps ont la propriété de reconnaître des structures antigéniques (ou épitopes) généralement situés à la surface de l'agent infectieux et de s'y fixer spécifiquement avec une haute affinité. La neutralisation du pathogène par les anticorps peut s'effectuer de différentes façons. Certains anticorps s'associent aux structures de surface de l'agent pathogène ou aux toxines sécrétées par celui-ci, inhibant leur fixation et leur pénétration dans les cellules cibles et de ce fait empêchent l'infection (Zwick et Burton, 2007 ; Helander et al., 2004). D'autres vont activer des cellules phagocytaires et des cellules "natural killer" (NK) chargés de lyser des cellules infectées. Les anticorps sont produits par les plasmocytes issus de l'activation des lymphocytes B après une succession de réactions cellulaires provoquées par la stimulation antigénique. Certains antigènes ont la capacité d'activer directement les lymphocytes B (c'est la réaction

thymo-indépendante), mais la plupart des antigènes requièrent la présence de lymphocytes Th pour induire la production d'anticorps (réaction thymo-dépendante).

C'est au niveau des ganglions et de la rate que les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques) activent les cellules Th qui, dès lors, se multiplient. D'autre part, l'interaction des cellules B matures avec l'antigène déclenche un processus d'apprêtement de l'antigène, puis, la présentation de celui-ci combiné à des molécules de classe II du CMH à la surface de leurs membranes. L'interaction entre les lymphocytes Th CD4+ et les cellules B spécifiques provoque l'activation et la prolifération des lymphocytes B. Une partie des cellules se différencie en plasmocytes, qui sont responsables de la production d'anticorps à faible affinité, essentiellement du type IgM. Une partie des lymphocytes B migrent dans des follicules primaires où, avec l'aide de lymphocytes Th spécifiques et en présence de l'antigène, ils forment un centre germinatif (MacLennan, 1994).

Dans ces centres germinatifs se produit le changement d'isotype des anticorps, ainsi que les mutations somatiques et la sélection des clones B produisant les anticorps ayant de plus fortes affinités pour l'antigène (MacLennan, 1994). Les cellules B issues de ces centres germinatifs se développent soit en plasmocytes qui migreront dans la moëlle osseuse pour y sécréter des anticorps de haute affinité (IgG et IgA), soit en cellules B à mémoire qui permettront une réponse immunitaire plus rapide et puissante en cas de réexposition au(x) même(s) antigène(s) (Fig 1.1).

Des anticorps de même spécificité peuvent appartenir à différentes classes (IgG, IgA, IgM) selon leur affinité et site de production. Ils peuvent être libres dans le plasma (IgG, IgM) ou dans les fluides biologiques présents au niveau des muqueuses (IgA). La quantité et la répartition des différents isotopes évoluent en fonction du temps après stimulation antigénique (Phan et al., 2003). Les IgM sont immédiatement présentes lors

de l'infection et augmentent avant les IgG et les IgA. La production des IgG et des IgA nécessite la présence de cellules Th.

### **1.2.3 La réponse vaccinale**

Lors de la première inoculation d'un antigène, les cellules Th effectrices sont activées et prolifèrent rapidement. Ce sont des cellules à durée de vie courte (quelques jours), dont le nombre atteint un maximum au bout d'une semaine puis diminue pour atteindre un niveau basal en deux à six semaines. La population de cellules Th à mémoire atteint un maximum après deux semaines, puis leur nombre se réduit lentement pour rester détectable après plusieurs années. La réponse humorale suivant la première inoculation est lente et les plasmocytes qui en sont issus sont responsables de la production d'IgM d'abord puis d'IgG protecteurs (Zafiroopoulos et al., 1997). Le nombre des cellules B à mémoire généré par le processus vaccinal est maximal après dix à quinze semaines, avant de diminuer lentement. Les cellules B à mémoire sont le support de la réponse anamnestic en anticorps.

Lors d'un nouveau contact avec l'agent infectieux, les cellules T à mémoire interviennent en favorisant une réaction anticipée et intensifiée. Les cellules Th CD4+ à mémoire donnent très rapidement naissance à des taux élevés de nouvelles cellules T effectrices et cytotoxiques. Les cellules Th CD4+ participent également à la réactivation de la réponse immunitaire en anticorps avec un délai de production raccourcis. Lors de ce deuxième contact avec l'antigène, le titre en anticorps augmente rapidement et atteint des taux plus élevés en IgG et en IgA de même spécificité et d'affinité plus élevée avec un haut pouvoir protecteur (Sha et al., 2005). Ainsi, par la vaccination, on cherche une mise en place rapide de moyens de défense spécifique afin d'anticiper sur le développement de l'infection et d'en protéger l'organisme.

### **1.3 Classification des vaccins**

Les vaccins peuvent être classés en quatre catégories en fonction de la nature du matériel antigénique qu'ils renferment (Baxter, 2007) : i) agents vivants atténués, ii) agents infectieux inactivés, iii) sous-unités d'agents infectieux, iv) toxines inactivées.

#### **1.3.1 Les vaccins issus d'agents infectieux atténués**

Les vaccins atténués sont générés à partir d'agents pathogènes qui créent une infection minimale. Les agents infectieux sont manipulés et multipliés en laboratoire jusqu'à ce qu'ils perdent leur caractère pathogène. Ils conservent cependant leurs caractéristiques antigéniques. Leur administration provoque une réponse immunitaire spécifique. Des exemples de ce type de vaccin comprennent les vaccins contre la fièvre jaune, la varicelle, la rubéole, les oreillons, la rougeole, la tuberculose (vaccin BCG), les gastroentérites à Rotavirus (Reisinger et Block, 2008). Les vaccins atténués ne sont pas dépourvus de risques infectieux. Il est déconseillé de les utiliser chez des patients immunodéprimés, qui pourraient devenir porteurs chroniques de la maladie.

#### **1.3.2 Les vaccins issus d'agents infectieux inactivés ou tués**

Les vaccins inactivés sont exempts de tout risque infectieux. Une fois les agents infectieux identifiés et isolés, ils sont multipliés puis tués chimiquement ou thermiquement. Contrairement aux vaccins vivants atténués, plusieurs injections sont généralement nécessaires pour obtenir une immunisation suffisante et il faut habituellement pratiquer des rappels (Lieu et al., 2001). L'efficacité de la réponse générée par les vaccins inactivés est inférieure à celle obtenue avec les vaccins atténués vivants mais les risques d'infection sont fortement diminués. Des préparations d'agents infectieux inactivés sont utilisées pour vacciner contre la grippe, la poliomyélite, le choléra, la peste ou l'hépatite A (Stauffer et al., 2006).

### **1.3.3 Les vaccins constitués de sous-unités d'agents infectieux**

Ces vaccins, contrairement aux vaccins atténués et inactivés, ne comportent plus l'agent pathogène entier mais seulement des fractions antigéniques susceptibles d'induire une réponse immunitaire. Les composantes antigéniques des vaccins sous-unitaires peuvent être d'origine protéique, polysidique, ou conjugués. Les antigènes protéiques mettent en jeu la réaction thymo-dépendante et font intervenir les cellules Th CD4+ à mémoire. Une nouvelle injection déclenche une ascension des IgG protectrices et une activation cellulaire durable. Par exemple, les vaccins contre les virus de l'hépatite B, les papillomavirus ou encore la coqueluche, sont constitués de protéines de surface virale. Les antigènes polysidiques induisent une réponse thymo-indépendante mettant en jeu les cellules B et des anticorps IgM et IgG spécifiques. La réponse engendrée par ce type de vaccins est de courte durée. Les vaccins conjugués, obtenus en assemblant des polysides spécifiques à une protéine porteuse, peuvent permettre de produire une réponse plus intense et plus durable (Marcato et al., 2005). Cette approche d'antigènes conjugués a été utilisée pour les vaccins méningococciques et pneumococciques.

### **1.3.4 Les vaccins constitués de toxines inactivées**

Un aggravement des symptômes lors d'une infection est parfois dû à la production de toxines par l'agent infectieux. Cette stratégie vaccinale utilise des toxines détoxifiées chimiquement ou thermiquement, appelée toxoïde ou plus généralement anatoxine, pour susciter une réponse immune dirigée contre celle-ci. Le tétanos ou la diphtérie sont deux exemples de maladies dont les symptômes sont dus à la production de toxines par l'agent infectieux et contre lesquelles on produit des vaccins anatoxiques (Prado et al., 2001).

## 1.4 Les modes de vaccination

Une administration optimale et sécuritaire des vaccins est essentielle pour garantir leur innocuité et leur efficacité. Les méthodes d'administration sont basées sur les résultats d'essais cliniques permettant de déterminer la dose, la voie et le calendrier d'administration de chaque vaccin. La plupart des vaccins sont administrés via la voie parentérale (IM ou SC) et la voie orale (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2 :** Classification de vaccins utilisés contre différents types de maladies infectieuses en fonction de leur méthode d'administration (d'après Nikkels et al., 2005).

<b>Injection intramusculaire (IM)</b>	<b>Injection sous-cutanée (SC)</b>	<b>Voie orale</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diphtérie</li> <li>- Tétanos</li> <li>- Hépatites A</li> <li>- Hépatites B</li> <li>- H. Influenza type b</li> <li>- Pneumocoque</li> <li>- Typhoïde</li> <li>- Rage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poliomyélite</li> <li>- Varicelle</li> <li>- Rubéole</li> <li>- Rougeole</li> <li>- Oreillons</li> <li>- H. Influenza</li> <li>- Fièvre jaune</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rotavirus</li> <li>- Cholera</li> <li>- Typhoïde</li> </ul>

### 1.4.1 La vaccination par voie orale

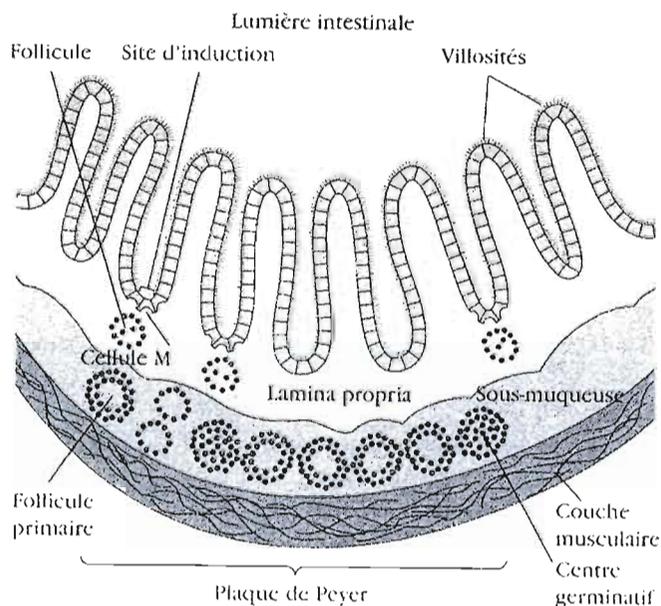
La vaccination par voie orale présente de nombreux avantages par rapport à la vaccination par voie parentérale. L'une des raisons qui préconise l'immunisation par voie orale tient compte du fait que pour une majorité d'infections, le point de départ est une surface mucoale (McGhee et al., 1994). Il s'avèrerait donc intéressant de vacciner au niveau des sites mucoaux pour y induire une réponse immune protective. Des exemples d'infections mucoales sont causées par : *Helicobacter pylori*, *Vibrio*

*cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigène, *Clostridium difficile* au niveau du tractus gastro-intestinal; *Mycoplasma pneumoniae*, le virus de l'influenza, le virus respiratoire syncytial au niveau du tractus respiratoire; HIV, *Chlamidia*, *Neisseria gonorrhoeae*, le virus de l'herpès simplex au niveau du tractus urogénital (Holmgren et al., 2003). Ces agents microbiens représentent un intérêt pour le développement de nouvelles cibles vaccinales capable d'induire une réponse immune protectrice afin d'empêcher l'adhésion et la colonisation au niveau de la muqueuse épithéliale (pour des bactéries non invasives) ou bien la pénétration et la réplication dans la muqueuse (pour les virus et les bactéries invasives) ou encore de bloquer l'adhésion et l'action de toxines microbiennes (Holmgren et al., 2003). Dans plusieurs cas, la fonction protectrice effectrice issue du procédé vaccinal générera une réponse locale en anticorps sécrétoires de nature IgA et une mémoire immunologique associée aux muqueuses. La vaccination par voie orale faisant appel au principe de l'immunité mucoale et impliquant le système immunitaire commun aux muqueuses (SICM), permet donc d'immuniser à un endroit (par exemple, l'intestin) et de protéger a un autre (par exemple, le poumon) (Holmgren et al., 2003; Foss et Murthaugh, 2000; Ogra et al., 2001).

#### 1.4.2 L'immunité mucoale

La surface des muqueuses des systèmes digestif, respiratoire et urogénital représente des sites d'entrée pour diverses pathogènes (McGhee et al., 1994). Ces surfaces membranaires sont protégées par les tissu lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT : *mucosal-associated lymphoid tissue*). La *lamina propria*, située sous la couche de cellules épithéliales, contient un grand nombre de cellules B, de plasmocytes, de cellules Th activées et de macrophages au sein d'amas lâches. Le nombre de follicules lymphoïdes situés dans la *lamina propria* d'un individu sain se situe aux alentours de 15 000. La couche sous-muqueuse, située sous la *lamina propria*, contient des plaques de Peyer, dont la structure nodulaire est constituée de 30 à 40 follicules lymphoïdes (Fig 1.2). Les plaques de Peyer représentent la principale structure du MALT. Comme les

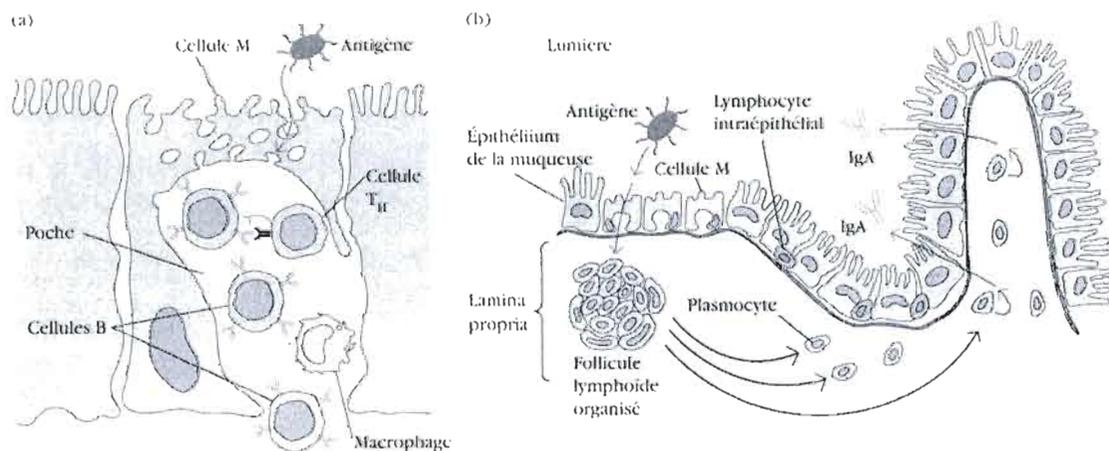
follicules lymphoïdes de la rate et des ganglions, ceux qui composent les plaques de Peyer peuvent se développer en follicules secondaires avec la création de centres germinatifs. L'importance fonctionnelle du MALT est due à sa grande population de plasmocytes, dont le nombre est nettement supérieur à celui des plasmocytes de la rate, des ganglions et de la moelle osseuse réunis (Schmuker et al., 2003).



**Figure 1.2 :** Coupe schématique de la muqueuse bordant l'intestin montrant un nodule de follicule lymphoïde qui constitue une plaque de Peyer dans la sous-muqueuse. La *lamina propria* intestinale contient des amas lâches de cellules lymphoïdes et des follicules diffus (d'après Goldsby et al., 2000).

La réponse immunitaire générée au niveau des muqueuses des tractus respiratoire, digestif et génito-urinaire est due au MALT. Régulièrement, des échantillons antigéniques étrangers provenant de la lumière de la muqueuse sont mis en contact avec les tissus lymphoïdes associés. Au niveau intestinal, le transport de l'antigène est effectué par des cellules épithéliales spécialisées, dépourvues de

microvillosité, appelées cellules M (Corr et al., 2008). Ces cellules présentent une profonde invagination, ou poche, dans leur membrane basolatérale dans laquelle se situent des cellules B, des cellules T et des macrophages (Fig 1.3a). Les antigènes luminaux sont internalisés par invagination membranaire dans des vésicules qui sont transportées de la membrane luminaire vers la membrane de la poche sous-jacente. Les vésicules fusionnent ensuite avec la membrane de la poche, délivrant ainsi les antigènes activateurs d'une réponse potentielle aux amas de lymphocytes localisés dans la poche (DesRieux et al., 2005).



**Figure 1.3 :** (a) Représentation d'une cellule M contenue dans la muqueuse intestinale. L'antigène est transporté à travers la cellule et est libéré dans la grande poche basolatérale. Une population lymphocytaire est présente au sein de cette cavité cellulaire. (b) Mécanisme de production d'IgA au niveau des sites inductifs. Après avoir été activées, les cellules B se différencient en plasmocytes producteurs d'IgA qui migrent le long de la sous-muqueuse (d'après Goldsby et al., 2000).

Le processus d'internalisation de l'antigène varie en fonction de la taille de celui-ci. Les grandes particules et les bactéries vont être internalisées par phagocytose impliquant un réarrangement du cytosquelette associé à la membrane apicale (Liang et al., 2001), tandis que les virus vont induire une internalisation par endocytose avec

formation de puits de clathrine (Owen, 1977). Les cellules M sont localisées dans des sites inductifs de la muqueuse intestinale se situant sous les follicules lymphoïdes organisés (Fig 1.2). Les antigènes transcytosés à travers la muqueuse par les cellules M vont activer les cellules B au sein de ces follicules lymphoïdes. Les cellules B activées se différencient en plasmocytes, quittent les follicules pour se relocaliser plus en bordure de la *lamina propria*, puis secrètent des anticorps de classe IgA. Ces anticorps sont ensuite transportés à travers la barrière épithéliale puis libérés en tant qu'IgA sécrétoire dans la lumière (Kadaoui et Corthésy 2007), où ils peuvent entrer en interaction avec des antigènes (Fig 1.3 b).

.

Les cellules M sont à la base d'un processus de libération continue de fractions antigéniques. Les muqueuses dans lesquelles elles se localisent constituent une barrière efficace contre l'entrée des pathogènes car les jonctions serrées qui unissent les cellules épithéliales les unes aux autres empêchent la pénétration du pathogène. Certains pathogènes intestinaux exploitent la cellule M comme voie d'entrée à travers la barrière de la muqueuse (Sansonetti et Phalipon, 1999). Dans certains cas, le pathogène est internalisé par la cellule M et transporté, comme les antigènes, jusqu'à la membrane basale. Dans d'autres cas, il se lie à la cellule M et rompt cette cellule, permettant son entrée dans la muqueuse intestinale. Parmi les pathogènes qui utilisent les cellules M comme moyen de transport, le virus de la poliomyélite, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* et *Vibrio cholerae*, en sont les exemples les plus fréquents (Jensen et al., 1998; Ouzilou et al., 2002; Hamzaoui et al., 2004).

## CHAPITRE II

### EXPRESSION D'ANTIGÈNES PAR DES PLANTES TRANSGÉNIQUES

#### 2.1 Aspects généraux

De nouvelles molécules thérapeutiques sont mises au point chaque année mais ne sont pas exploitées pour des raisons de capacité limitée et des coûts élevés des systèmes actuels de productions. Par exemple, les anticorps recombinants testés à fins d'immunothérapie contre diverses pathologies utilisent des cultures de cellules animales telles que les CHO (*Chinese Hamster Ovary*) pour leur production (Gomord et al., 2004a). Les quantités d'anticorps nécessaires en immunothérapie se situent entre de 2 et 5 g par patient par année. De plus, la diversité d'anticorps demandée pour les traitements est importante. Il est ainsi nécessaire pour l'industrie pharmaceutique de se doter de systèmes efficaces de production afin de répondre à la demande dans ce domaine (Daniell et al., 2001a).

Dans le cadre de la production de protéines recombinantes, différents systèmes sont utilisés: les bactéries, les levures, les cultures de cellules animales, les animaux transgéniques et les plantes transgéniques. Les avantages liés à l'utilisation de bactéries pour la production de protéines recombinantes sont la simplicité du transfert de gènes et l'obtention de volumes de production importants. Toutefois, les mécanismes de modification post-traductionnelle des protéines ne sont pas présents chez les bactéries. Celles-ci serviront à l'expression de molécules relativement simples comme l'insuline, l'interféron ou l'hormone de croissance humaine (Gomord et al., 2004b). Pour l'obtention de modifications post-traductionnelles de la protéine d'intérêt, des cultures de levures peuvent être utilisées (Capell et al., 2004). Pour la glycosylation sur des sites spécifiques, les systèmes de cultures de cellules animales seront utilisés (Daniell et al., 2001a). Les cultures de cellules de mammifères, notamment les CHO, sont utilisées pour

la production de molécules recombinantes retrouvées commercialement. Les animaux transgéniques offrent la possibilité de glycosylation, ainsi que des rendements de production de protéines recombinantes importants. Cependant, l'obtention d'animaux transgéniques est un processus long et coûteux (Capell et al., 2004). Un exemple de protéine recombinante exprimée chez l'animal est celui de la butyrylcholinestérase humaine qui se retrouve dans le lait de la chèvre (Baldassarre et al., 2009).

L'utilisation de plantes transgéniques offre une capacité de production élevée en terme de biomasse obtenue et peut facilement être ajustée à la demande. De façon générale, les coûts de production reliés aux plantes transgéniques sont inférieurs aux coûts générés par l'utilisation de cultures de microorganismes en fermenteur ou de cellules de mammifères (Twyman et al., 2003). La culture de plantes transgéniques est similaire à celle de plants sauvages desquels ils sont issus et ne nécessitent pas d'équipements particuliers, sauf ceux en conformité avec les normes environnementales. L'utilisation de plantes transgénique offre une sécurité lors de la génération de protéines recombinantes à usage thérapeutique car il n'existe pas de pathogènes communs entre les plantes et les humains (Daniell et al., 2001a et Capell et al., 2004).

## **2.2 Les vaccins mucosaux à base de plantes transformées**

Les plantes sont relativement faciles à transformer et représentent une source peu coûteuse de biomasse. Leur utilisation pour générer des protéines à usage biopharmaceutique est développée depuis plusieurs années. La production d'un vaccin sous-unitaire en plantes transgénique a été réalisée pour la première fois par l'expression d'un antigène de surface du virus de l'hépatite B (HbsAg) chez le plant de tabac (Mason et al. 1992). Depuis, plusieurs autres groupes ont utilisé les plantes pour l'expression d'antigènes viraux et bactériens. Par exemple : la sous-unité B d'*Escherichia coli* (Mason et al., 1998), la sous-unité B de la toxine cholérique (Arakawa et al., 1998), la protéine VP1 du virus de la fièvre aphteuse (FMDV : *foot-and-mouth disease virus*)

(Wigdorovitz et al., 1999), une protéines de capsid du virus de Norwalk (Tacket et al., 2000), la protéine F du virus respiratoire syncytial (Sandhu et al., 2000) et l'hémagglutinine du virus de la rougeoles (Huang et al., 2001) ont été exprimées chez les plantes et administrées oralement chez l'animal et l'humain afin de déterminer leur pouvoir immunogène.

Les plants de tabac et de tomate ont été utilisés en tant que systèmes pilotes dans des études préliminaires pour l'expression de vaccins. Ces plantes sont caractérisées par une transformation facile ainsi qu'un pouvoir de régénérescence élevé. Par ailleurs, lors de l'expression d'antigène chez le tabac, une extraction protéique est nécessaire avant l'administration orale du vaccin. En ce qui concerne l'expression d'antigène chez la pomme de terre, la cuisson de celle-ci pour la rendre comestible entrainerait une dénaturation des protéines transgénique et diminuerait de ce fait leur pouvoir immunogène. D'autres candidats potentiels comme plantes hôtes telles que la banane, le maïs, la laitue et la luzerne ont été utilisées pour l'expression de vaccins (Streatfield et al., 2003; Tacket and Mason, 1999; Wigdorovits et al., 1999).

### **2.3 La luzerne, candidate de choix en moléculculture**

La luzerne (*Medicago sativa L.*) est une espèce végétale présentant plusieurs avantages pour la production de protéines recombinantes (Busse et al., 2002; St-Amand et al., 2000; Khoudi et al., 1999). La pérenité des plants de luzerne permet l'utilisation de la plante mère pour générer des boutures présentant un génotype identique et donc évite la production des graines de façon annuelle pour assurer l'identité génotypique (Piccioni et al., 1997). Plusieurs croisements sont parfois nécessaires à l'obtention du génotype souhaité et, lors de la production de graines, des variations dans l'expression du gène introduit peuvent survenir d'une génération à l'autre produisant des individus différents. La stabilité du taux d'expression des protéines d'intérêt constitue un élément clé en moléculculture (Busse et al., 2002 et Khoudi et al., 1999). La pérenité de la luzerne

assure ainsi la production d'une grande quantité de biomasse comparativement à une espèce qui ne génère qu'une seule récolte par année (Busse et al., 2002).

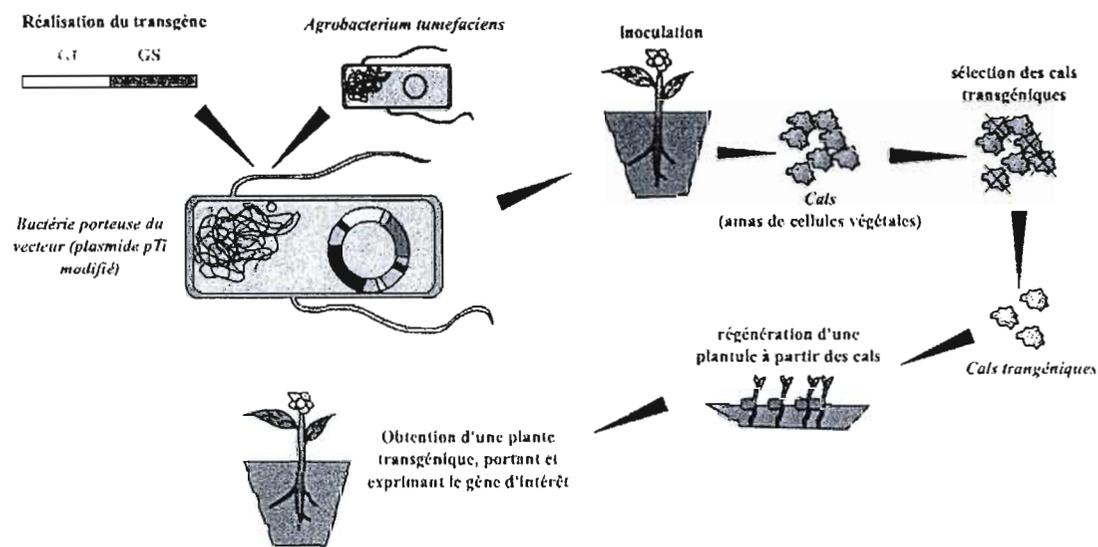
La luzerne effectue la fixation d'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium* et est donc cultivée sans apport d'azote supplémentaire. La culture de cette espèce est effectuée sans précautions particulières (pesticides) car la luzerne n'est pas la proie d'un grand nombre de ravageurs (champignons ou insectes) (Busse et al., 2002). Le faible taux de métabolites secondaires (tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes) dont la présence augmente le nombre d'étapes de purification et donc les coûts de production et la haute teneur en protéines dans ses feuilles font du plant de luzerne un bioréacteur de choix lors de l'expression de protéines recombinantes (Erickson et al., 2002). La moléculture végétale présente donc des avantages concrets pour la production de protéines thérapeutiques, tant au niveau des rendements obtenus que des étapes de purification nécessaires lors de la production. L'entreprise québécoise, *Medicago inc.*, utilise la luzerne comme bioréacteur végétal destiné à la production de protéines thérapeutiques.

Un des problèmes majeurs rencontré lors de l'implantation en champ de tels plants transgéniques est le confinement génétique (Nilsson et al., 1998; Daniell et al., 2001a et b et Skinner et al., 2003). Le confinement génétique d'une culture transgénique est la prévention de la dispersion des grains de pollen issus des ces plants transformés dans l'environnement. Inversement, il faut empêcher les grains de pollen présents naturellement dans l'environnement de féconder les fleurs de la culture transgénique. Le confinement génétique est assuré par la stérilité mâle et femelle des plants transgéniques.

## 2.4 Transformation de plantes

### 2.4.1 Obtention de plantes transgéniques

L'obtention d'une plante génétiquement modifiée se fait en plusieurs étapes successives (Fig 2.1).



**Figure 2.1** : Schématisation de l'obtention d'une plante transgénique par utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* (d'après Tzfira et Citovsky, 2006).

La première étape consiste en la sélection du gène d'intérêt responsable, par exemple, d'une résistance à certains insectes ou codant pour une protéine recombinante. Le gène d'intérêt doit être isolé et intégré dans une construction plasmidique associant souvent un gène marqueur permettant de sélectionner les cellules transformées. La construction est ensuite amplifiée afin de disposer d'une quantité suffisante de matériel génétique lors de son introduction dans les cellules végétales.

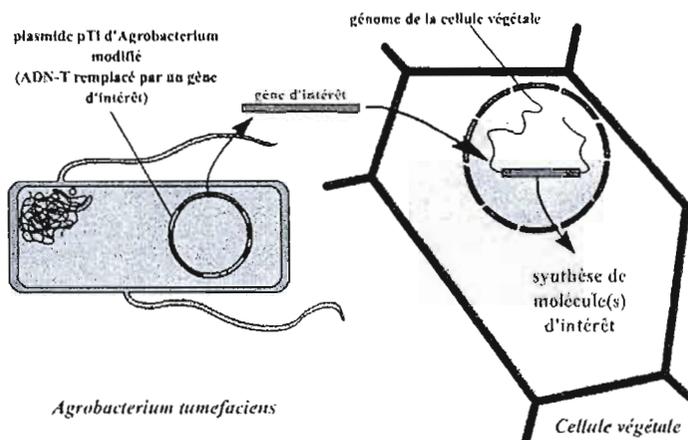
La seconde étape concerne le transfert de gène dans la cellule végétale et est principalement réalisée par deux techniques : la transformation biologique et un transfert de gènes direct (Harwood et al., 2009 ; Harwood et Smedley, 2009). La transformation biologique utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, ayant la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante. Ainsi, une construction génétique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. Cette technique est la plus couramment utilisée (Harwood et al., 2009). L'autre technique est basée sur un transfert de gène direct faisant intervenir soit une projection de microparticules enrobées d'ADN (biolistique) dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un injecteur à particules soit l'introduction d'ADN dans des protoplastes (cellules végétales dépourvues de paroi) par l'action d'un agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation) (Harwood et Smedley, 2009).

Une troisième étape consiste à régénérer et évaluer les plantes transformées après sélection de cellules transformées. Ces dernières se développent d'abord en cals, larges amas de cellules indifférenciées, sur lesquels on observe l'apparition de pousses après quelques semaines. Elles sont alors placées dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines. Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre.

La régénération *in vitro* des cellules transformées est une étape difficile à maîtriser. Aussi, le génotype, le type de tissus et les conditions de culture sont choisis en fonction de leur aptitude à la régénération (Weeks et al., 2008). Les individus régénérés subissent une analyse protéomique pour confirmer l'expression et l'insertion de la construction génétique au sein de leur génome. Des études sur l'expression du gène ont lieu à plusieurs stades, ce qui permet de caractériser le niveau d'expression et le comportement de la plante exprimant le transgène. Les plantes transformées obtenues sont soumises à des croisements contrôlés pour étudier les modalités de transmission du transgène à la descendance.

## 2.4.2 Technique d'agroinfiltration

L'agroinfiltration est une méthode utilisée en biologie végétale qui consiste à induire l'expression transitoire d'un gène dans une plante (Kopertekh et Schiemann, 2005). Pour réaliser cette technique, une suspension d' *Agrobacterium tumefaciens* contenant le gène d'intérêt inséré dans une construction plasmidique, est injectée au niveau des feuilles de la plantes. Après transfert de gène depuis *Agrobacterium tumefaciens* vers la cellule végétale, la plante exprime de façon transitoire le transgène d'intérêt.



**Figure 2.2 :** Schématisation du transfert d'un gène d'intérêt provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le génome de la plante (d'après Tzfira et Citovsky, 2006).

Les bénéfices de cette technique par rapport à la génération de plantes transgéniques sont la rapidité et la facilité d'expression de l'exogène (Kopertekh et al., 2005). Une fois injectée dans la feuille, *Agrobacterium tumefaciens* est responsable de la transformation d'une partie des cellules végétales, et le transgène y sera exprimé de façon transitoire. Les deux espèces végétales habituellement agroinfiltrées pour l'expression transitoire de protéines d'intérêt sont *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* (Kościańska et al., 2005).

## **2.5 Taux d'expression de protéines exogènes**

Les systèmes utilisant des plantes transgéniques permettent de produire des protéines en quantités importantes et apportent des modifications post-traductionnelles spécifiques aux plantes (ajout de résidus xylose), fortement immunogènes chez l'humain (Gomez et al., 2008). Les taux d'expression du transgène dépendent de l'espèce végétale, du mode de transformation, du système d'expression et de la protéine produite (Guo et Wang, 2008). Une approche alternative pour l'expression des protéines hétérologues consiste à intégrer le gène d'intérêt dans le génome chloroplastique. Ainsi par exemple, chez le tabac, on a réussi à obtenir 10000 copies du gène par cellule et une accumulation de la molécule recombinante de l'ordre de 47% du stock protéique (Daniell, 2006).

### **2.5.1 Exemples de molécules obtenues**

L'hormone de croissance (Somatotropine) a été la première protéine humaine exprimée dans les plantes. Retrouvée dans les chloroplastes, cette hormone peut représenter jusqu'à 7% des protéines totales (Kim et al., 2008). L'expression de l'interféron a été mise au point dans le riz en 1994 et la production de la phosphatase alcaline humaine a été effectuée dans des cellules végétales en 1999. L'expression du collagène sous forme de complexe glycoprotéique a été réalisée chez le tabac transgénique en 2000. L'hémoglobine, la lactoferrine et l'albumine dont les besoins mondiaux sont de l'ordre de 300 tonnes par an, sont également produites dans des cellules végétales (Choi et al., 2003). Le coût de production par les plantes est cinq fois moins élevé que celui de l'albumine purifiée à partir du plasma. La protéine native entière a été exprimée dans les plantes dès 1990 et une forte accumulation (11% des protéines totales) suite à la transformation chloroplastique a été observée (Fernandez-San, 2003). Pour la production de la lipase gastrique, des travaux font référence à la

production de l'enzyme active dans les grains du maïs (Zhong et al., 2006). Ainsi, 1 ha de plantes transgénique permettrait la production d'un kg d'enzyme pure.

### 2.5.2 Vaccins

Au niveau de l'expression de protéines immunogènes chez les plantes, un vaccin spécifique de l'hépatite B a été mis au point à partir de la pomme de terre exprimant dès lors un antigène de surface du virus. Après ingestion du féculent par la souris, il a été observé un déclenchement d'une réponse immunitaire (Youm et al., 2007). Deux candidats aux vaccins recombinants dits « comestibles » sont actuellement en cours de développement. Il s'agit de l'antigène dirigé contre la sous-unité B de *Escherichia coli* entérotoxigène et un antigène de capsid du virus de Norwalk (Santi et al., 2008). Un vaccin sous-unitaire pour la toxine cholérique et l'expression d'une glycoprotéine du virus rabique ont été réalisés dans la tomate (Jani et al., 2002).

### 2.5.3 Anticorps recombinants

En ce qui concerne l'expression d'anticorps chez les plantes, un anticorps chimérique IgG-IgA sécrétoire dirigé contre l'antigène de surface de *Streptococcus mutans* (agent des caries dentaires) a été produit dans le tabac (Ma et al., 1994). Un anticorps simple-chaîne (ScFv : *single chain variable fragment*) dirigé contre la glycoprotéine de surface de cellules de carcinome embryonnaires (CEA), a été produit dans le tabac (Ko et al., 2005). Ces types d'anticorps sont utilisés pour l'imagerie médicale et pour les traitements thérapeutiques des cas de cancer. Des anticorps ScFv ont été produits dans le tabac pour les traitements des lymphomes, et des IgG pour les traitements du cancer du colon (McCormick et al., 1999; 2003). On estime le coût de production par les plantes de 1 g d'IgG 10 à 20 fois moins important que le coût lié à l'utilisation de cellules animales. Cette diminution s'explique notamment par la diminution des étapes nécessaires à la purification des anticorps (Yu et al., 2008).

## CHAPITRE III

### L'AMIDON ET SES DÉRIVÉS

#### 3.1 L'amidon

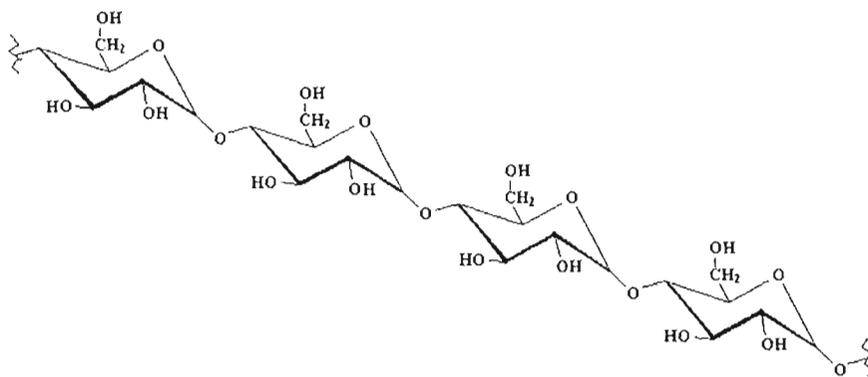
L'amidon (du latin *amylum*, non moulu) est un polysaccharide de réserve utilisé par les végétaux supérieurs pour stocker de l'énergie, au même titre que le glycogène chez les animaux et que l'inuline chez les plantes de la famille des *Asteraceae* (Chippendale, 1972). L'amidon se présente sous forme de granules blanches dont le diamètre varie entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (Wurzburg, 1986). Les particules d'amidon, générées par les plantes lors de la photosynthèse, sont composées principalement de polymères de glucose représentant 98 à 99 % de la masse du grain (French, 1984). Les particules d'amidon, visibles au microscope et insolubles dans l'eau froide, sont localisées dans les amyloplastides de la cellule végétale (Balmer et al., 2006). Les principales sources d'amidon sont le maïs, la pomme de terre, le blé, et, dans une moindre mesure, le riz, le manioc, les pois et le sorgho.

Lors de l'étude structurale de l'amidon, l' $\alpha$ -amylase a été utilisée pour cliver les liaisons glucosidiques et générer du maltose et des fragments de petites tailles (Bailey et al., 1937). Plusieurs types d'amylases sont disponibles et génèrent plusieurs patrons de clivage. L' $\alpha$ -amylase d'origine animale (amylase salivaire et pancréatique), végétale ou bactérienne s'attaque aux liaisons glucosidiques  $\alpha$ -(1-4) de façon aléatoire et libère du maltose et des fragments plus ou moins importants de chaîne d'amidon, appelés dextrines (Bird et Hopkins, 1954). La  $\beta$ -amylase, d'origine végétale, s'attaque aux liaisons  $\alpha$ -(1-4) en partant de l'extrémité non réductrice de la chaîne et libère du maltose et des dextrines (Hopkins et al., 1948). Un troisième type d'amylase a été répertorié, appelée gluco-amylase ou  $\gamma$ -amylase. On la retrouve chez les levures, les champignons et dans les lysosomes du foie des mammifères. Cette

exo-amylase est responsable de l'hydrolyse des liaisons glucosidiques alpha-(1-4) à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne et libère du glucose (Belenky et Rozenfeld, 1972). Une hydrolyse totale de l'amidon par traitement acide libère du D-glucose (Robin et al., 1974; Dumazert, 1950). Au sein du grain d'amidon, les unités de D-glucose sont liées les unes aux autres par des liaisons de type alpha-(1-4) (95-96 %) et alpha-(1-6) (4-5 %) (Williams, 1968). A leurs extrémités C<sub>1</sub>, les polymères qui composent l'amidon possèdent une fonction pseudo-aldéhyde réductrice. En 1945, Schoh a montré que l'amidon est composé de deux polymères : l'amylose, macromolécule non ramifiée, et l'amylopectine, macromolécule ramifiée.

### 3.1.1 Structure de l'amylose

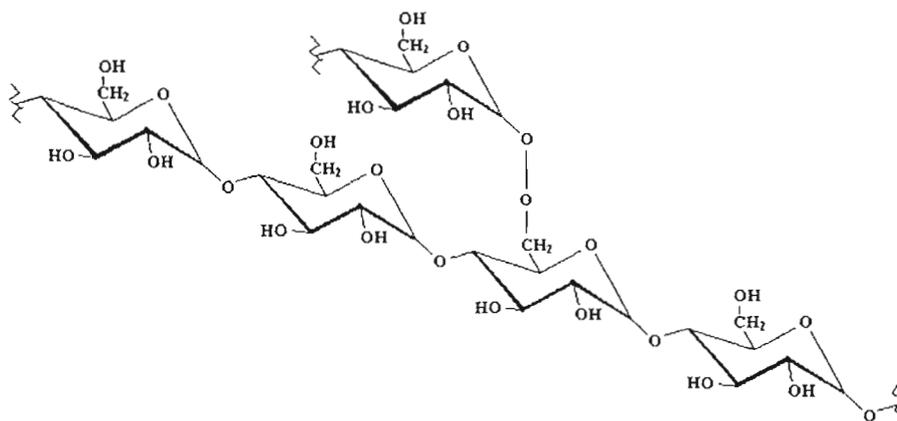
L'amylose (Fig 3.1) possède une masse molaire moyenne comprise entre  $10^5$  et  $10^6$  g/mol et est généralement présente de façon minoritaire dans la composition de l'amidon. La structure de l'amylose est non ramifiée et formée par des résidus glucopyranose liés par des liaisons alpha-(1-4)-D-glucosidique. On observe cependant une faible quantité de liaisons alpha-(1-6)-D-glucosidique (Banks et Greenwood, 1975).



**Figure 3.1** : Représentation schématique de l'amylose : polysaccharide formé d'unités de D-glucopyranose connectées par des liaisons alpha-(1-4)-D-glucosidiques.

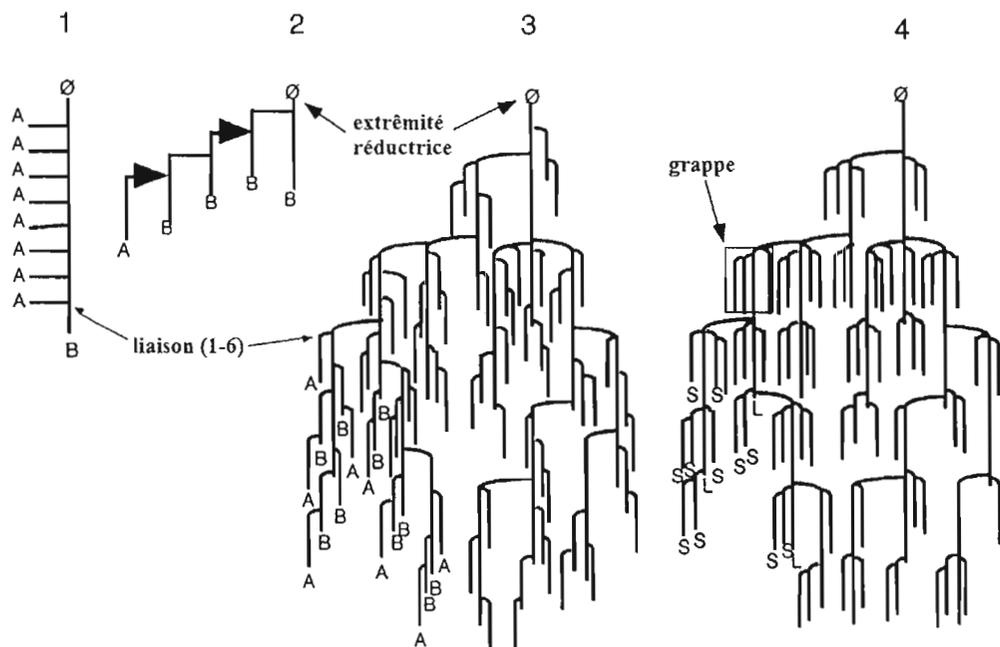
### 3.1.2 Structure de l'amylopectine

L'amylopectine (Fig 3.2) possède une masse molaire moyenne comprise entre  $10^7$  à  $10^8$  g/mol et est présente de façon majoritaire dans la composition de l'amidon. La structure de l'amylopectine est ramifiée et formée par des résidus glucopyranoses reliés entre eux par des liaisons alpha-(1-4) et par 5 à 6 % de liaisons alpha-(1-6)-D-glucosidique (Whistler et Daniel, 1984).



**Figure 3.2 :** Représentation schématique de l'amylopectine : Polysaccharide formé d'unités de D-glucopyranose connectées par des liaisons alpha-(1-4)- et alpha-(1-6)-D-glucosidiques.

Plusieurs modèles ont été proposés pour caractériser la structure moléculaire de l'amylopectine. Les plus connus parmi ceux-ci sont les modèles de Haworth en 1937, Staudinger en 1937, Meyer et Bernfeld en 1940, Meyer et Fuld en 1941 (Fig 3.3). Le modèle de Meyer est le plus reconnu à ce jour (Buléon et al., 1998). Il peut être représenté par un ensemble de grappes de chaînes courtes (S) reliées entre elles par des chaînes plus longues (L) (Fig 3.3 (4)). Les chaînes courtes forment les arborescences terminales et les chaînes longues forment l'ossature de la molécule.



**Figure 3.3 :** Modèles proposés pour la structure de l'amylopectine. (1) Modèle de Haworth (2) Modèle de Staudinger (3) Modèle de Meyer et Bernfeld; les chaînes A sont non ramifiées et dirigées vers l'extérieur de molécule, les chaînes B sont ramifiées et le groupement réducteur de la molécule est porté par une chaîne B (4) Modèle de Meyer et Fuld présentant une architecture de type faisceau (d'après Buléon et al., 1998).

L'amylose et l'amylopectine de l'amidon peuvent être séparés en fonction de leur masse moléculaire et de leur degré de solubilité. La proportion en amylose et en amylopectine de l'amidon est fonction de son origine végétale et du degré de maturation du grain. L'amidon contenu dans un grain peu développé est plus faible en amylose que celui contenu dans un grain mature. La majorité des amidons contient 20-30% d'amylose et 70-80% d'amylopectine (Tableau 3.1) (Langlois et Wagoner, 1967).

D'un point de vue des propriétés de l'amidon, on compte sa capacité à la formation de films, caractéristique due aux ponts hydrogènes réalisés entre les hélices des molécules d'amylose (Zallie, 1989). L'amylopectine, plus large et plus ramifié que

l'amylose, ne permet pas la formation de gels. La manipulation des gènes, codant pour le matériel enzymatique nécessaire à la synthèse de l'amylose et de l'amylopectine, de façon à inverser la tendance de production de ces deux polysaccharides générera des végétaux capables de produire un amidon riche en amylose pouvant contenir entre 50% et 80% d'amylose. La production d'amidon riche en amylose a pour but de rendre le produit plus facilement manipulable (Sajilata et al. 2006). Les noms commerciaux donnés à ces types de produits (National Starch USA) sont représentatifs du taux d'amylose que leur amidon contient. Hylon® V contient 50% d'amylose, Hylon® VII contient 70% d'amylose et Hylon® IX contient 90% d'amylose.

**Tableau 3.1 :** Teneurs en amylose et forme des grains d'amidon provenant de différentes sources botaniques (d'après Duprat et al., 1980).

	<b>Amidon %</b>	<b>Forme</b>	<b>Amylose %</b>
<b>Céréales</b>			
Maïs normal	71 - 74	Polyédrique	28
Blé	67,2 – 68,4	Lenticulaire,	26
Avoine vêtue	41,5 – 43,3	Polyédrique	27
Orge vêtue	54,8 – 59,3	Lenticulaire	22
<b>Tubercules</b>			
Pomme de terre	65 - 85	Ellipsoïdale	21
<b>Légumineuses</b>			
Féverole	30 - 43	Sphérique ovoïde	24
Pois lisse	43 - 48	Réniforme	35
Pois ridés	32 - 37	Rosette	66

### 3.1.3 Les éléments non-glucidiques de l'amidon

Parmi ses éléments non-glucidiques, l'amidon contient une faible quantité de lipides et de protéines (Le Meur, 1984; Baldwin, 2001). Les lipides (0,1 – 1,0 % de la masse) sont présents à la surface du grain d'amidon ou forment des complexes

d'inclusion dans l'hélice d'amylose. Les protéines (0,05 – 0,25 % de la masse) se retrouvent à la surface du grain d'amidon (Seguchi et Yamada, 1989) et se divisent en deux catégories: les protéines de stockage (gluten et gliadine) et les protéines associées aux grains d'amidon (SGAPs : *Starch granule-associated proteins*) (Baldwin, 2001). La présence de ces éléments a une influence sur les propriétés rhéologiques de l'amidon (Muhrbeck et Tellier, 1991).

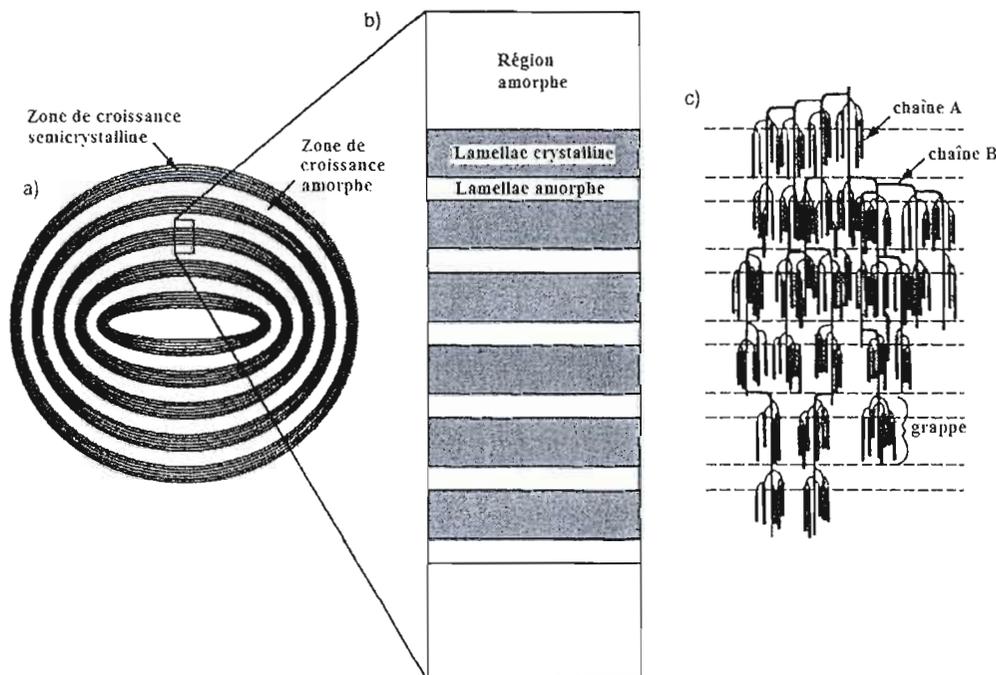
### 3.1.4 La structure granulaire

La forme et la dimension des grains d'amidon est variable selon l'origine végétale (Fannon et BeMiller, 1992). Par exemple, le blé possède des grains d'amidon de 8 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre de forme polyédrique; pour le maïs, les grains sont de 15 à 25  $\mu\text{m}$  de diamètre; pour le riz, ils sont de 4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre et pour la pomme de terre ils atteignent jusqu'à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et sont de forme ellipsoïdale (Tableau 3.1). L'étude de l'organisation structurale du grain d'amidon a été effectuée par microscopie à lumière naturelle pour laquelle on observe des couches concentriques autour du centre de croissance du grain d'amidon appelé le hile (Figure 3.4).

En microscopie aux rayons X, on observe une structure radiale répétitive de 8 - 10 nm de période correspondant à la dimension d'une grappe d'amylopectine (Gallant et Guilbot, 1969). Il a été montré par la méthode de réticulation chimique que les chaînes d'amylose se positionnent entre les molécules d'amylopectine dans les zones organisées (Jane et al., 1993). La concentration et la taille moléculaire de ces deux polymères sont différentes au hile et en périphérie du grain d'amidon. Au sein du granule d'amidon, l'amylose organisée sous forme de double hélice constitue la portion cristalline (ordonnée) du granule, en alternance avec des régions amorphes (Blanshard, 1987).

Selon l'analyse des diagrammes de diffraction aux rayons X, on distingue plusieurs types de polymorphismes d'amidon d'origines végétales différentes (Veregin et al., 1987):

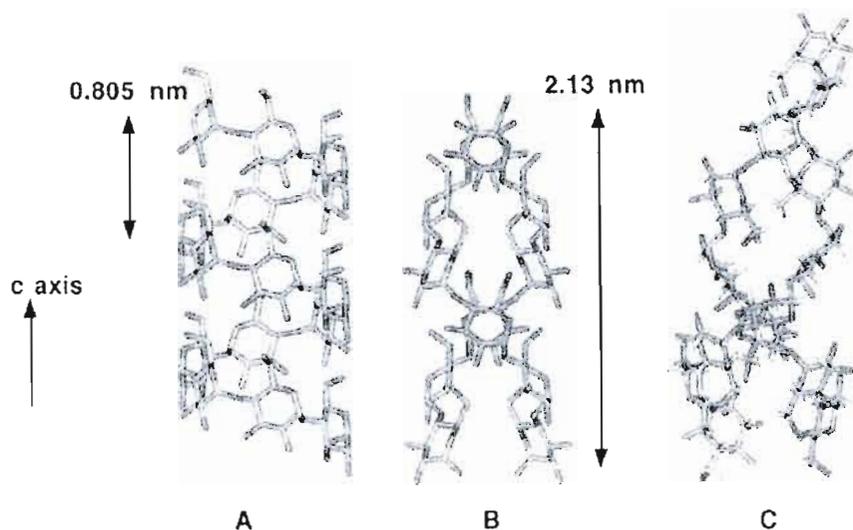
- Un polymorphisme de type A, caractéristique des amidons de céréales.
- Un polymorphisme de type B, caractéristique des amidons de tubercules.
- Un polymorphisme de type C (intermédiaire entre les deux autres), caractéristique des amidons de légumineuses.
- Un polymorphisme de type V est observé dans des régions amorphes de l'amidon.



**Figure 3.4 :** Représentation des différents niveaux d'organisation au sein d'un grain d'amidon: (a) Représentation de l'alternance des structures semi cristallines et amorphes dans un grain d'amidon. (b) Agrandissement d'une région semi cristalline. (c) Représentation de l'amylopectine au sein de la structure semi cristalline. Les chaînes A adoptent une structure en double hélice, tandis que les chaînes B regroupent les différents ensembles de chaînes A (d'après Jenkins et Donald, 1995).

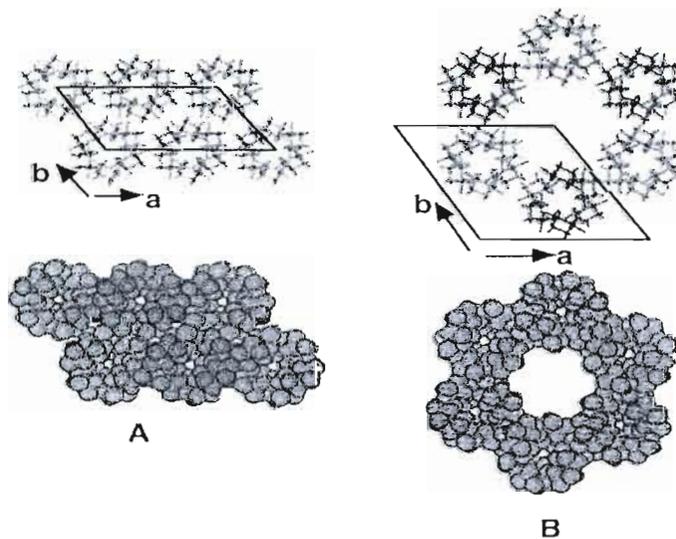
### 3.1.5 L'organisation spatiale de l'amylose et de l'amylopectine

Les arrangements moléculaires adoptés par les chaînes de glucose au sein de l'amidon et ses composants suivent une architecture hélicoïdale. Les types d'hélices que peut former le polysaccharide et l'organisation spatiale de celles-ci sont représentatifs du polymorphisme adopté par l'amidon (Buléon et al., 1998). On dénombre trois sortes d'arrangements hélicoïdaux (Fig 3.5.). Le premier est une hélice simple, avec un pas de 0,805 nm composée de 6 molécules de D-glucose et est caractéristique du polymorphisme de type V (Fig 3.5.a). Cette hélice d'amylose possède un intérieur relativement hydrophobe pouvant emprisonner une colonne de molécules d'eau à raison d'une molécule d'eau pour deux résidus de glucose. Le second arrangement est une double hélice d'amylose avec un pas de 2,13 nm composé de 6 unités de D-glucose et est caractéristique des polymorphismes de type A, B et C (Fig 3.5.b). Le troisième est une double hélice formée par l'enchevêtrement de deux chaînes courtes d'amylopectine et est caractéristique de la structure moléculaire adoptée par l'amidon au niveau des zones cristallines (Fig 3.5.c).



**Figure 3.5 :** Conformations hélicoïdales présentes dans l'amidon et ses dérivés : (A) Simple hélice d'amylose (B) Double hélice d'amylose (C) Double hélice formée par deux chaînes courtes d'amylopectine (d'après Buléon et al., 1998).

Les polymorphismes de types A et B sont constitués de doubles hélices d'amylose (Buléon et al., 1998). Des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions de Van der Waals sont responsables de la stabilisation de ces structures. Ces polymorphismes sont similaires au niveau de la composition hélicoïdale mais diffèrent au niveau de l'arrangement des hélices les unes par rapport aux autres (Fig 3.6). Dans la structure de type A, les doubles hélices sont empaquetées de façon antiparallèle selon une unité cellulaire monoclinique ( $a = 2.124 \text{ nm}$ ,  $b = 1.172 \text{ nm}$ ,  $c = 1.069 \text{ nm}$ ,  $\gamma = 123.5^\circ$ ), contenant 8 molécules d'eau. Dans la structure de type B, les doubles hélices sont empaquetées selon une unité cellulaire hexagonale ( $a = b = 1.85 \text{ nm}$ ,  $c = 1.069 \text{ nm}$ ), contenant 36 molécules d'eau. Ces différences de composition en eau de ces deux polymorphismes sont en relation directe avec les espaces vides présents entre les hélices.



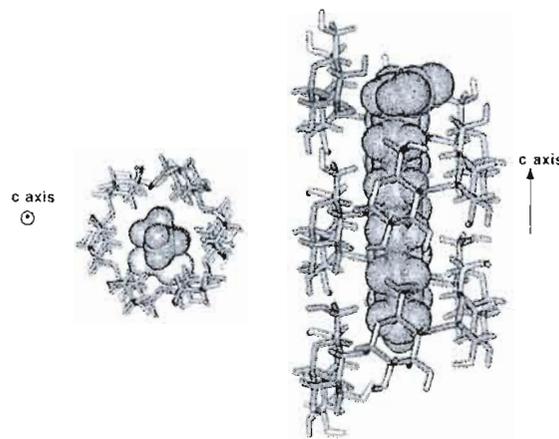
**Figure 3.6 :** Représentations schématiques des structures cristallines de l'amylose de type A et de type B (d'après Buléon et al., 1998).

L'amylose dans un polymorphisme V anhydre, lorsqu'il est exposé à une solution aqueuse, évolue vers une forme V hydratée par introduction de molécules d'eau dans les espaces séparant les hélices. Cette hydratation se poursuit jusqu'au ratio d'une molécule

d'eau par résidu de glucose. L'hydratation se termine par la pénétration de molécules d'eau à l'intérieur de l'hélice provoquant un changement de polymorphisme de type V vers le polymorphisme de type B (Néel, 1972; Shiftan et al., 2000).

### 3.1.6 Les complexes de l'amylose

Le polymorphisme V de l'amylose, caractérisé par une cavité centrale, se retrouve associé avec différents types de molécules telles que de l'iode, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), les alcools, ou les acides gras, lorsqu'il est cristallisé (Banks et Greenwood, 1971). Le complexe que forme l'iode avec l'amylose est bleu et possède une  $\lambda_{\max}$  située à 630 nm tandis que l'amylopectine fixe l'iode en forme un complexe brun avec une  $\lambda_{\max}$  située à 540 nm. Il est possible de déterminer la teneur en amylose et en amylopectine d'un amidon par mesure d'absorbance à ces deux longueurs d'onde (John et al., 1983;). L'amylose se complexe à des acides gras dont la longueur de chaîne se situe entre 14 et 18 carbones (Krog, 1971) par emprisonnement de celui-ci au sein de la cavité hydrophobe de l'hélice d'amylose (Fig 3.7). Les complexes de ce type sont des clathrates.



**Figure 3.7 :** Représentation schématique du complexe formé par la chaîne aliphatique d'un acide gras emprisonné dans la cavité hydrophobe d'une hélice d'amylose (d'après Buléon et al., 1998).

## **3.2 Propriétés physicochimiques de l'amidon**

### **3.2.1 La solubilité**

En milieu aqueux, le comportement du grain d'amidon dépend de la température et de la concentration (Whistler et Daniels, 1984). À température ambiante, l'amidon n'absorbe qu'une quantité minimale d'eau : celle-ci pénètre d'abord les régions amorphes de la structure et forme des ponts hydrogènes avec les chaînes polysaccharidiques avoisinantes générant un léger gonflement du grain. Si la température augmente, la capacité d'absorption est augmentée et au final un éclatement de la structure granulaire va permettre la solubilisation de la totalité de l'amylose et de l'amylopectine et générer une solution colloïdale. Par augmentation de la température, on atteindra le stade de gélatinisation de l'amidon.

### **3.2.2 La gélatinisation**

Le processus de gélatinisation est effectué par chauffage de l'amidon en milieu aqueux et s'accompagne d'une perte de la structure cristalline (Gidley et Cooke, 1991). Lors de cette phase, les polysaccharides composant l'amidon sont expulsés du grain d'amidon, en commençant par des molécules d'amylose de petite taille. La gélatinisation s'accompagne d'un gain d'entropie et d'une augmentation de la viscosité (Blanshard, 1979). Lors du chauffage d'une suspension d'amidon, on observe un gonflement du grain jusqu'à une température à laquelle se produit la dispersion du granule en milieu aqueux. Cette température se situe généralement aux alentours de 45-70 °C et est appelée température de gélatinisation. Elle varie en fonction de l'origine végétale de l'amidon (Leach, 1965). Afin de déterminer la température de gélatinisation de l'amidon (point d'éclatement du grain), la mesure de viscosité et de la biréfringence sous lumière polarisée sont utilisés. La gélatinisation est également possible à la température

ambiante par l'utilisation de solvants comme l'ammoniac ou le DMSO. La gélatinisation issue de ce procédé est appelée gélatinisation chimique.

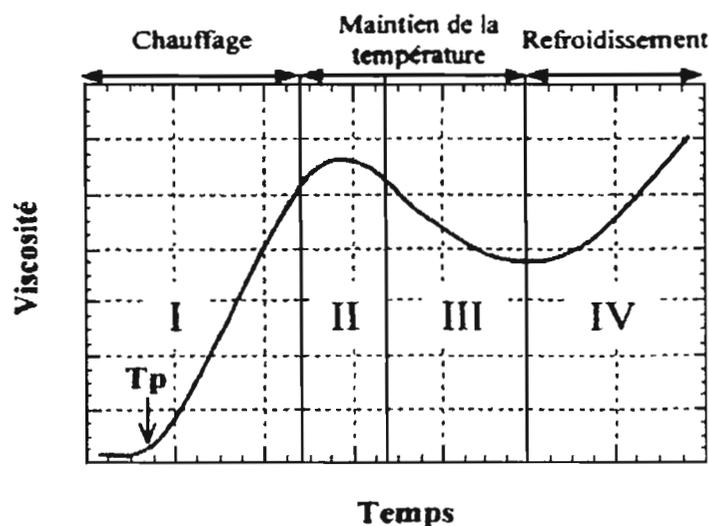
### **3.2.3 La gélification**

La gélification aboutit à la formation d'un gel soit une substance de consistance visqueuse ayant tendance à gonfler par absorption d'eau et pouvant former une suspension. Cette propriété physique est observée chez les polysaccharides de haut poids moléculaire. Après la phase de gélatinisation, l'amylose et l'amylopectine se retrouvent en milieu aqueux. De part leur différence de solubilité, ceux-ci vont se séparer en deux phases qui sont toutes les deux susceptibles de former des gels (Rindlav-Westling et al., 2002). La gélification de l'amylose est plus rapidement obtenue (40 min) (Miles et al., 1985) par rapport à celle de l'amylopectine (plusieurs semaines) (Ring et al., 1987). Lors de la gélification de l'amylose, on observe une association des chaînes polymériques les unes aux autres par des liaisons hydrogène. Cette association moléculaire est détruite par chauffage et se reforme par refroidissement. Les gels d'amylose, une fois séchés, formeront des films avec un haut degré de cristallinité (Rindlav-Westling et al., 1998).

### **3.2.4 La rétrogradation**

Après avoir dépassé la température de gélatinisation, lors de la descente en température de la solution polymérique, le phénomène de rétrogradation est observé. Les molécules d'amylose vont avoir tendance à s'approcher les unes des autres et à s'orienter de façon parallèle pour former une structure cohésive (Foster, 1985) La rétrogradation s'accompagne d'une augmentation de la viscosité et une résistance aux attaques enzymatiques (Néel, 1965). La réassociation de molécules d'amylose par établissement de liaisons hydrogène entre groupements hydroxyles forme un gel dont la structure et la consistance dépendent notamment de la concentration en molécules d'amylose. Dans une solution diluée, le phénomène de rétrogradation s'accompagne de précipitation des

fibres d'amylose (Foster, 1965). La rétrogradation, à la différence de la gélification, génère des structures cristallines d'amylose insolubles. Par analyse de diffraction aux rayons X, il a été mis en évidence que la structure cristalline adoptée par les molécules d'amylose au sein de ces agrégats est de type B (Wu et Sarko, 1978). Il est possible de tracer une courbe de la viscosité d'une suspension d'amidon en fonction du temps (Figure 3.8).



**Figure 3.8 :** Courbe de viscosité de Brabender (Leach, 1984).

Ce diagramme se compose de 4 phases :

- Phase I : Augmentation de température de la suspension d'amidon et hydratation progressive des grains d'amidon avec augmentation de la viscosité de la solution.
- Phase II : Augmentation continue de la viscosité, à température constante, jusqu'à ce que le granule ait atteint l'hydratation maximale.
- Phase III : Destruction de la structure du grain et diminution de la viscosité de la suspension d'amidon.
- Phase IV : Refroidissement avec augmentation de la viscosité de la suspension due au phénomène de rétrogradation.

### **3.3 Les amidons modifiés**

L'amidon naturel offre des possibilités d'utilisation plutôt restreintes d'où le développement des possibilités de modifications du polymère. Il existe plusieurs techniques pour obtenir des amidons modifiés avec lesquelles on produit un changement dans la structure de base de la molécule (Tharanathan, 2005). Les amidons modifiés impliquent un ou plusieurs traitements physiques, chimiques ou enzymatiques.

#### **3.3.1 Traitements physiques**

Par l'action conjuguée de la température ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) et d'un milieu acide, l'hydrolyse presque complète de l'amidon est obtenue. Les coupures des chaînes d'amidon se font au hasard (Dumazert, 1950), entraînant une diminution de la viscosité de la solution. Ce traitement permet de rendre l'amidon soluble dans l'eau froide et d'obtenir des préparations dont l'épaississement reste modéré. Ces types d'amidons modifiés sont utilisés dans le secteur de l'industrie agro-alimentaire, par exemple lors de la fabrication de confiseries gélifiées. Les traitements par irradiation combinée avec l'action de certains agents chimiques aboutissent à des modifications des caractéristiques physico-chimiques de l'amidon (Kovacs et Keresztes, 2002). Le traitement de l'amidon par irradiation UV conduit à la dépolymérisation des chaînes et à la formation des radicaux libres. L'action des rayons gamma sur l'amidon aboutit à la formation de peroxydes d'hydrogène (Berger et Saint-Lèbe, 1971) de même qu'à une réorganisation des structures cristallines et amorphes du grain (Rayas-Duarte et Rupnow, 2006).

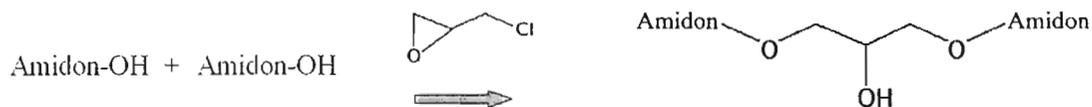
#### **3.3.2 Traitement enzymatique**

L'amidon est un substrat naturel des différentes classes d'amylases. Ces enzymes agissent en effectuant des coupures au niveau des liaisons glucosidiques du polymère. L'alpha-amylase, qualifiée d'enzyme liquéfiante, va générer des coupures dans l'amidon

de façon à libérer du maltose et des maltodextrines. Ce procédé porte le nom de liquéfaction de l'amidon. La gamma-amylase, qualifiée d'enzyme saccharifiante, est responsable de la saccharification de l'amidon c'est-à-dire l'hydrolyse de celui-ci pour la libération de glucose (Caldini et al., 1999). La susceptibilité de l'amidon à l'attaque enzymatique est fonction de son origine végétale (Sotnikova et al., 2003). On différencie les amidons susceptibles à l'action enzymatique en fonction du taux de compaction des chaînes polymériques limitant la capacité de diffusion d'un fluide à l'intérieur du grain d'amidon. Par exemple l'amidon du manioc montre une grande sensibilité aux enzymes par rapport à l'amidon du maïs ou de la pomme de terre. On constate aussi que l'amidon solubilisé est plus sensible à l'action enzymatique que l'amidon natif à cause d'une meilleure exposition des chaînes.

### **3.3.3 Traitements chimiques**

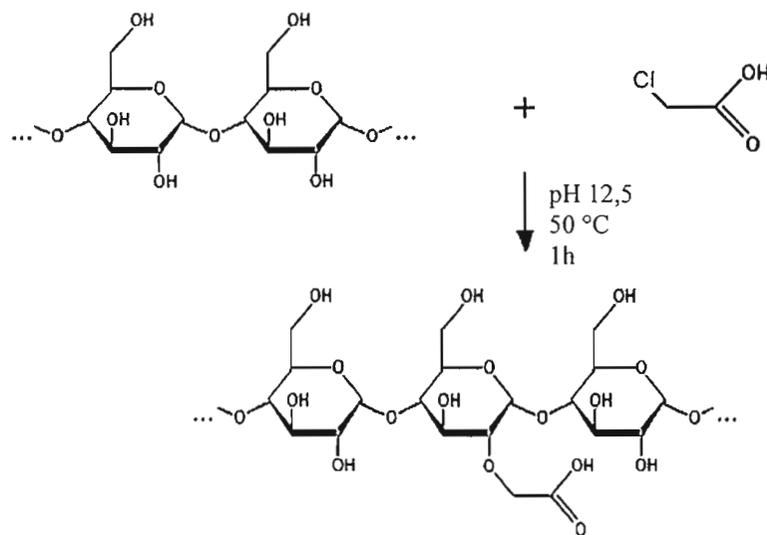
Plusieurs formes d'amidon peuvent être obtenues après traitements chimiques. Parmi celles-ci on peut citer les amidons oxydés, les amidons réticulés et les amidons substitués. Une forme oxydée de l'amidon est obtenue par traitement avec différentes quantités d'agent oxydant (par exemple, l'hypochlorite de sodium) (Kuakpetoon et Wang, 2006). Ce type de traitement provoque le blanchiment des impuretés colorées associées à l'amidon et génère différents degrés de viscosité de l'amidon modifié en fonction de la quantité d'hypochlorite de sodium utilisée (Chang et al., 2008). Une forme réticulée de l'amidon est obtenue par création de ponts intermoléculaires renforçant les ponts hydrogènes déjà présents entre les chaînes. La réticulation est obtenue par utilisation d'agents réticulants [épichlorhydrine (Fig 3.9), oxychlorure de phosphore, trimétaphosphate sodique] ou par l'intermédiaire de cations bi- ou multivalents (ions calcium). La solubilité de l'amidon diminue avec l'augmentation du taux de réticulation qui crée une structure tridimensionnelle plus liée (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1994). Différents degrés de réticulation peuvent être obtenus en variant le rapport amylose/agent de réticulation.



**Figure 3.9 :** Représentation schématique de la réaction de réticulation de l'amidon par l'épichlorhydrine.

L'amidon présente de nombreux groupements hydroxyles relativement accessibles, et donc peut représenter un candidat pour les réactions de substitution par une large gamme de molécules. L'addition de groupements fonctionnels sur l'amidon permettra notamment de moduler sa solubilité en milieu aqueux. Le carboxyméthyl amidon (CMA) illustre un cas d'amidon modifié par substitution. Le CMA présente une température de gélatinisation diminuée par rapport à l'amidon natif (Leach, 1965). Lors de la réaction de carboxyméthylation, des groupements hydroxyles du polysaccharide ont été substitués par des groupements carboxyméthyle issus du traitement avec une solution d'acide monochloroacétique (Fig 3.10). Il a été montré, par analyse de spectres RMN, que la modification de l'amidon se fait préférentiellement sur l'oxygène lié au carbone 2 par une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (SN2) (Kragten et al., 1992; Calinescu et al., 2007, Massicotte et al., 2008). La capacité de gonflement de polymères substitués par des groupements ioniques est dépendante de la force ionique et du pH du milieu environnant (Mulbacher et al., 2001; 2004).

Pour un polymère substitué, deux valeurs sont indicatrices de l'importance de la substitution. Le degré de substitution (DS) est défini comme étant la proportion d'unités polymériques substituées par rapport au nombre d'unités polymériques totales. Il peut être exprimé en % d'unités polymériques substituées, en % de groupements hydroxyles substitués ou en méquiv/g. Le degré de substitution molaire (DSM) est défini par le nombre moyen de groupements ajoutés par macromolécule (Ho et al., 1972).



**Figure 3.10 :** Représentation schématique de la réaction de substitution de l'amidon par l'acide monochloroacétique.

D'autres exemples de substitution de l'amidon sont représentés par le succinate amidon qui montre une capacité importante à former des films (Trubiano, 1995), l'acétate amidon dont la synthèse est effectuée en milieu anhydre par l'intermédiaire de l'anhydride acétique et dont l'intérêt commercial réside dans sa propriété de thermoplasticité (Jarowenko, 1986), le diéthylaminoéthylamidon qui possède une affinité importante pour les substances chargées négativement et est utilisé en papeterie (Solarek, 1986) et finalement, l'éthyle et le méthylamidon qui sont utilisés dans l'industrie du textile.

### 3.4 Applications industrielles

L'amidon est utilisé pour plusieurs applications et sous plusieurs formes dans l'industrie. Il peut y être utilisé à l'état naturel, sous forme de poudre ou de film, modifié physiquement, chimiquement ou enzymatiquement (Radley, 1976). L'amidon est un produit naturel d'origine végétale totalement comestible. Il est utilisé dans le domaine

alimentaire comme épaississant tant au niveau domestique qu'industriel. Son pouvoir de gélification entraîne une augmentation de la viscosité du milieu auquel il est rajouté. L'amidon est utilisé comme additif ou agent de remplissage pour les processus à fermentation lente et comme agent gélifiant dans le domaine de la confiserie. Les propriétés liantes de l'amidon peuvent être mises à profit dans certaines nourritures en granules (exemple : nourriture pour animaux, céréales, etc.). Dans l'industrie papetière, l'amidon est en général utilisé pour augmenter la résistance du papier aux déchirures et à l'humidité. Au sein de l'enchevêtrement des fibres de cellulose qui composent le papier, l'amidon joue un rôle d'agent de surface responsable de la consolidation de l'ensemble de la structure. Il est aussi présent comme composante dans le papier pour effectuer des impressions de haute qualité. L'amidon est utilisé dans l'industrie du tissu pour solidifier les fibres de coton et de nylon face à la destruction mécanique (MacGregor et Greenwood, 1980). L'amidon est aussi utilisé lors de la coloration de textile comme stabilisateur de couleurs pour empêcher la diffusion lors de la teinture.

L'amidon natif et modifié trouve son importance dans plusieurs applications pharmaceutiques. Il y est notamment utilisé comme agent de remplissage pour des formulations solides. Les dérivés d'amidon peuvent également jouer un rôle de liant, de désintégrant et de lubrifiant lors de la fabrication des comprimés (Trubiano, 1995). Des composés dérivés d'amidon modifié sont aussi utilisés dans les traitements des ulcères gastriques (sulfate d'amylose) et comme agent antibactérien (complexe iode-amylose) (BeMiller, 1973). Par après, l'amidon riche en amylose réticulé a été incorporé dans la composition de comprimés comme excipient pour la libération contrôlée de médicaments (Lenaerts et al., 1991; 1992; Mateescu et al., 1994). Il a été montré que l'amylose réticulé possède d'intéressantes caractéristiques pour la libération contrôlée de médicaments administrés par voie orale. L'amidon réticulé à bas taux de réticulation (entre 2 et 9) est utilisé comme excipient pour la libération lente de médicaments et est connu sous le nom commercial de Contramid® (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1992; 1994; Dumoulin et al., 1999). Quant à l'amylose à haut taux de réticulation

(>15.0), il est utilisé comme agent liant et désintégrant et est connu sous le nom commercial de Liamid® (Cartillier et al., 1994; Dumoulin et al., 1994). Les applications des amidons modifiés seront abordées plus en profondeur dans le chapitre 3.5.3.

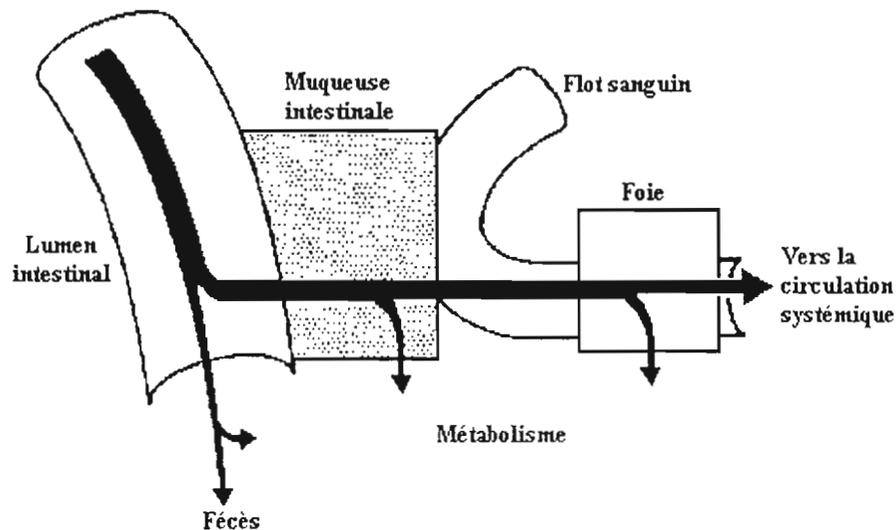
### **3.5 Formulations pharmaceutiques à base d'amidon**

#### **3.5.1 Administration orale d'agents bioactifs**

Les principes actifs utilisés dans l'industrie pharmaceutiques sont caractérisés par leurs paramètres pharmacocinétiques qui donnent une information sur le devenir du principe actif par l'organisme (Varma et al., 2004). Ces paramètres permettent de choisir la voie d'administration et d'adapter la posologie nécessaire à l'obtention d'un effet maximal du médicament. La pharmacocinétique d'un agent pharmaceutique tient compte de quatre processus après l'administration de celui-ci : son absorption, sa diffusion dans l'organisme, son métabolisme et son élimination. L'absorption est le processus par lequel le principe actif passe de son site d'administration à la circulation générale. La diffusion du principe actif dans l'organisme représente le transport de celui-ci vers le site d'action. Elle peut se faire par la voie systémique et, dans ce cas, ce paramètre est influencé par les interactions de l'agent pharmaceutique avec les protéines plasmatiques (albumine, globulines ou lipoprotéines) (De Buck et al., 2007). Le métabolisme du principe actif correspond à la transformation du médicament notamment par différents systèmes enzymatiques de l'organisme. Lorsqu'il est présent dans la circulation générale, le principe actif non utilisé est évacué de l'organisme par les mécanismes d'excrétion et/ou de métabolisation.

La voie d'administration du médicament a une influence sur les paramètres pharmacocinétiques (Hoffman et al., 2001). La voie intraveineuse est la voie de référence car toute la dose administrée atteint la circulation générale. Parmi les différentes voies d'administration du principe actif, on peut citer la voie intraveineuse, la

voie orale (ou per os), la voie sublinguale, la voie oculaire, la voie dermique, la voie rectale, la voie vaginale et la voie nasale (Morishita et Peppas, 2006). Un médicament administré par voie orale doit franchir deux barrières anatomiques avant de se retrouver dans le système circulatoire (Fig 3.11). Ces barrières sont l'épithélium du tube digestif et l'endothélium vasculaire (Bolin et al., 1986; Saffran et al., 1986).



**Figure 3.11 :** L'effet de premier passage aux niveaux intestinal et hépatique (d'après Rowland et Tozer, 1980).

Pour quantifier la quantité de principe actif ayant atteint le système, on détermine le paramètre de biodisponibilité qui est la fraction de la dose de médicament administrée atteignant la circulation générale. La quantité de médicament qui atteint la circulation générale est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif et donc de la dose administrée. La biodisponibilité est également influencée par d'autres processus d'élimination pré-systémique comme la dégradation dans la lumière intestinale, le métabolisme au niveau des entérocytes et le métabolisme des hépatocytes important lors du premier passage hépatique (Hee et al., 2000).

L'efficacité thérapeutique d'un médicament est influencée par la valeur des concentrations plasmatiques (Fig 3.12) et donc par la biodisponibilité de celui-ci. Partant de ce principe, on peut définir:

- Un seuil thérapeutique (ou seuil d'efficacité): concentration minimale en-dessous de laquelle aucune activité n'est obtenue
- Une limite supérieure (ou seuil de toxicité): concentration maximale au-delà de laquelle apparaissent des effets indésirables
- Un intervalle thérapeutique (ou domaine optimal): zone intermédiaire dans laquelle les concentrations sont à la fois actives et non-toxiques.

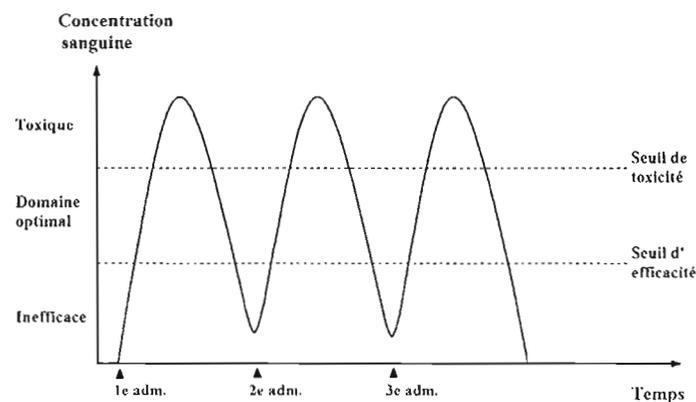
### **3.5.2 Formes galéniques**

Le domaine galénique de la pharmacie consiste en la production d'un médicament sous sa forme administrable. Les formes galéniques se composent généralement du principe actif et des excipients. Pour une administration orale, une formulation solide sous forme de comprimé est couramment utilisée. Dans certains cas, le comprimé administrable oralement est formulé de façon à générer un profil de libération contrôlée, pour lequel la vitesse de libération du principe actif est différente de celle d'une forme pharmaceutique conventionnelle. On distingue ainsi les formes à libération accélérée, différée, et ralentie ou prolongée (Dumoulin et al., 1998; 1999; Cartilier et al., 1997; Mateescu et al., 1994).

#### **3.5.2.1 Formes galéniques simples**

Les formes galéniques simples représentent le système de libération le plus classique et sont représentées par les comprimés et les capsules. Les comprimés peuvent être enrobés ou non par un mélange généralement composé de résines, gommes, sucres, colorants, etc et qui a pour objectifs notamment de protéger le principe actif contre

l'humidité ou la lumière et faciliter l'identification. Les capsules sont des formes galéniques constituées d'une enveloppe à base de gélatine. D'un point de vue pharmacocinétique, la quantité de principe actif incluse dans la forme galénique simple et la vitesse à laquelle il est absorbé par l'organisme sont représentatives de la biodisponibilité de celui-ci au site d'action (Greenblatt, 2006). Pour les formes galéniques simples, la libération de l'agent se fait de façon non contrôlée (Fig 3.12).



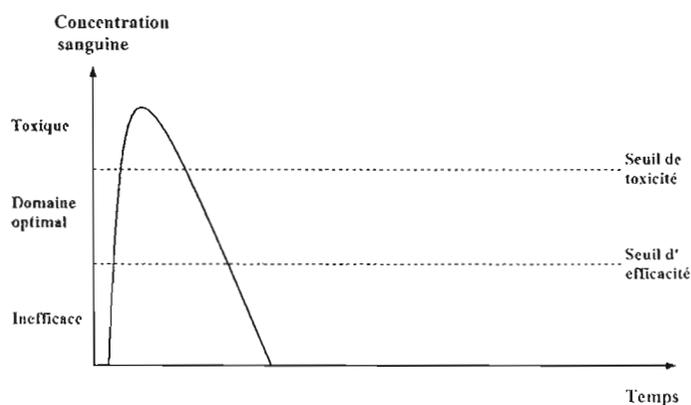
**Figure 3.12 :** Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration de comprimés de forme galénique simple (première, deuxième et troisième administration), sans contrôle de la libération.

A chaque administration du médicament, la concentration du principe actif au niveau sanguin atteint un maximum pouvant dépasser le seuil de toxicité et descend ensuite en dessous du seuil d'efficacité. Pour obtenir un effet du traitement administré, il est parfois nécessaire de recourir à plusieurs administrations afin de maximiser la période de temps passée dans l'intervalle de concentration optimale (Thrash, 1995).

### 3.5.2.2 Formes à libération accélérée

Pour certains principes actifs, une libération rapide est nécessaire afin d'obtenir un effet immédiat. Ce type de libération est nécessaire lors de l'usage des

antiépileptiques, des antipyrétiques, des analgésiques et des antiasthmatiques. Le moyen le plus efficace de parvenir à une biodisponibilité maximale en peu de temps est de passer par la voie intraveineuse, mais elle présente de risques de contamination important et nécessite un matériel approprié pour l'injection. Des formes galéniques pour la libération accélérée de principes actifs administrés par voie orale reposent sur l'utilisation d'agents désagrégants dans la formulation (Fig 3.13).



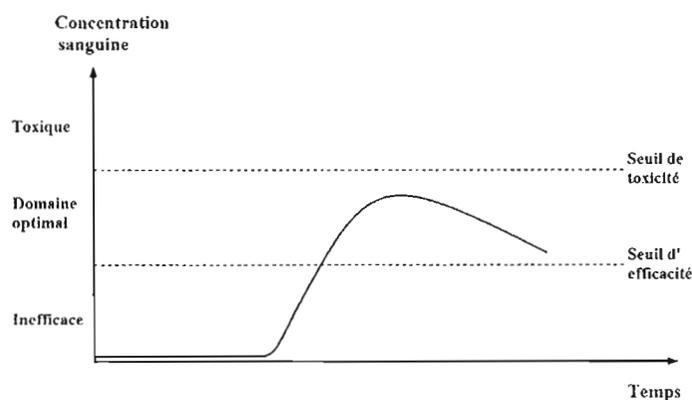
**Figure 3.13 :** Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération accélérée.

L'agent désagrégant (en présence d'un fluide aqueux) va déstabiliser la structure du comprimé, générant une libération presque instantanée du principe actif. La vitesse de libération obtenue par ce type de dosage est considérablement plus grande que dans les formes à libération simple. Les agents désagrégants sont généralement des molécules hydrophiles comme par exemple le polyvinyl pyrrolidone et l'amylose hautement réticulée (Dumoulin et al., 1994).

### 3.5.2.3 Formes à libération différée

La libération différée ou retardée se base sur une libération du principe actif après un certain intervalle de temps post administration (Fig 3.14).

Ces formes galéniques permettent une libération du principe à un endroit précis du tractus gastro-intestinal.



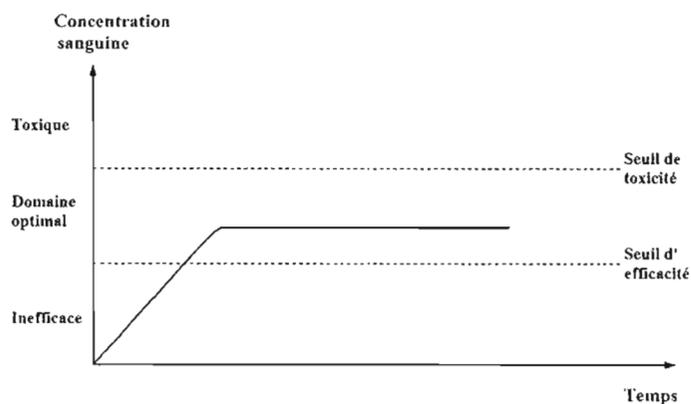
**Figure 3.14** : Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération différée.

C'est le cas par exemple des comprimés gastro-résistants, formulés de façon à supporter le passage gastrique puis à se désagréger dans l'intestin (Thrash, 1995; Calinescu et al., 2005; 2007). La gastro-résistance va fournir une protection du principe actif contre une dégradation due au pH acide tout comme une protection de la muqueuse stomacale dans le cas de la formulation d'agents irritants. La libération du principe actif au niveau intestinal est le cas le plus courant étant donné l'absorption importante de plusieurs types de principes actifs (agents chimiques, peptides, enzymes) au niveau intestinal (Langer, 1990).

#### 3.5.2.4 Formes à libération contrôlée ou prolongée

Les formulations à libération contrôlée sont des systèmes offrant une libération progressive du principe actif qu'ils renferment pendant une certaine échelle de temps (Fig 3.15). La vitesse à laquelle l'agent est libéré est, dans ce type de formulations,

maintenue constante de façon à offrir une concentration plasmatique en principe actif située dans la zone d'efficacité de celui-ci.



**Figure 3.15 :** Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération contrôlée.

Les systèmes à libération contrôlée, contrairement aux formes galéniques simples, ne se rendent pas au delà de la limite du seuil de toxicité. Les formes à libération prolongées maintiennent constante la concentration en principe actif au dessus du seuil d'efficacité de sorte que l'effet thérapeutique est optimal lors de l'administration du médicament pendant une période de temps considérable (Swarbrick et Boylan, 1990). Le profil de concentration sanguine du principe actif obtenu pour ces formes galéniques montre un plateau correspondant à une phase où la vitesse de libération du principe actif est égale à la vitesse de métabolisation ou d'élimination de celui-ci.

### 3.5.2.5 Les polymères dans les systèmes à libération contrôlée

Pour la réalisation de formes pharmaceutiques à libération contrôlée, des matériaux de nature polymérique sont utilisés pour générer des excipients « intelligents ». Ces composés sont généralement synthétiques, semi-synthétiques ou

naturels. Le rôle joué par le polymère varie en fonction du mécanisme de libération et de la forme médicamenteuse. Le polymère doit répondre aux trois conditions pour convenir aux exigences d'une forme à libération contrôlée (Doelker, 1985):

- il doit présenter certaines caractéristiques de compatibilité avec les propriétés physico-chimiques du principe actif et ses exigences pharmacocinétiques
- il doit posséder une résistance mécanique suffisante pour permettre l'administration orale de la forme médicamenteuse
- il doit être compatible avec les muqueuses et les tissus récepteurs au cas échéants (sinon l'agent actif doit l'être).

Plusieurs classifications des systèmes de contrôle de la libération de principes actifs ont été proposées, établies en fonction du processus physique (diffusion, érosion, gonflement et pression osmotique) qui gouverne le contrôle de la libération (Langer et Peppas, 1983).

### **3.5.3 L'amidon et ses dérivés dans la composition des comprimés**

#### **3.5.3.1 Agents liants**

De façon générale et préférée par les industriels, la fabrication de comprimés se fait par compression directe d'un mélange homogène de poudres des différents ingrédients. Sans être exclusifs, les excipients utilisés lors de la confection de comprimés sont généralement des agents de remplissage, des agents liants, des agents de désintégration et des lubrifiants. L'utilisation d'agents liants se justifie par le fait que l'intégrité du médicament doit être maintenue jusqu'à l'administration de celui-ci. Le comprimé doit posséder des propriétés mécaniques de dureté et de friabilité compatibles avec le principe actif qu'il renferme. La compression directe du principe actif peut parfois générer une masse cohérente et compacte mais pour la plupart, l'utilisation d'un

agent liant est nécessaire pour garantir l'intégrité du comprimé jusqu'à son utilisation. En plus de générer une structure compacte, l'agent liant doit être facile à mélanger, inerte et non-toxique. Les agents liants de compression sont en général des celluloses microcristallines comme celles vendues sous la marque AVICEL pH 101 ou AVICEL pH 102 (American Viscose Corporation). Les polyvinylpyrrolidones (PVPs) jouent également un rôle important dans l'agglomération des poudres et la compressibilité de la masse. Les PVPs de poids moléculaires compris entre 10 et 30 kDa (tels que le Povidone, le Kollidon® K15 ou le Plasdone XL) sont utilisés comme agents liants (Cros, 1995).

Une autre catégorie d'agent liant est représentée par l'amidon sous différentes formes. Par exemple, l'amidon riche en amylose, constitué de chaînes linéaires susceptible de s'associer entre elles, lorsque réticulé adéquatement, va générer une structure compacte lors de sa compression (Dumoulin et al., 1994; 1998b). La présence de l'amylopectine, composée de chaînes branchées, pourrait empêcher le rapprochement des chaînes d'amylose. L'utilisation d'un amidon riche en amylose est donc préférée pour garantir une efficacité du pouvoir liant de l'amidon. Une forme hautement réticulée de l'amidon riche en amylose, enregistré sous la marque commerciale Liamid®, est un cas particulier d'agent liant et en même temps d'agent désintégrant. Cet excipient particulier montre des propriétés liantes lors de la compression de la formulation et désintégrant lors de la dissolution du comprimé (Dumoulin et al., 1994; Cartilier et al., 1997). Pour garantir leur efficacité, les agents de liaison sont utilisés à des concentrations minimales de 20 % dans les formulations.

### **3.5.3.2 Agents désintégrants**

Pour certains principes actifs, il a été mentionné précédemment qu'une libération rapide est nécessaire. Pour ce faire, le comprimé devra se désagréger rapidement afin de permettre une biodisponibilité maximale du principe actif en peu de temps. Ce type de

libération est obtenu via l'addition d'agent désagrégeant au sein de la formulation. L'agent de désintégration agit seulement en présence de liquide et de ce fait permettra une intégrité du comprimé à sec jusqu'à sa prise. En présence de fluides digestifs, il permet une rupture de la masse solide du comprimé générant une libération rapide du principe actif qu'il renferme. Des exemples d'agents désagrégeant sont l'acide alginique, le carboxyméthyl cellulose sodique, les amidons gélatinisés, les amidons modifiés comme l'amidon glycolate de sodium (Primojel®) (Zhao et Augsburger, 2005) et l'amidon riche en amylose hautement réticulé (Liamid®) (Dumoulin et al., 1994; Cartilier et al., 1997).

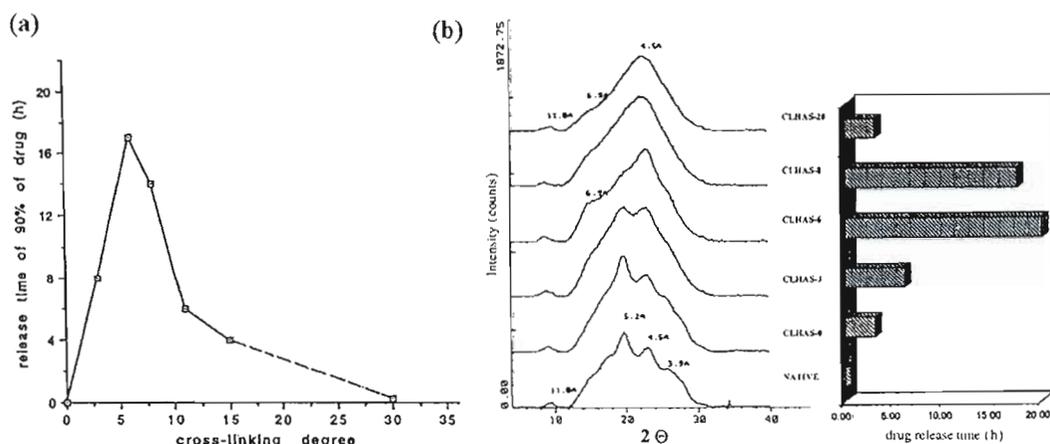
### **3.5.3.3 Agents diluants**

Une autre catégorie de substance présente dans les formes posologiques solides comprend les agents diluants. Ces excipients sont des substances inertes utilisées comme agent de remplissage (« fillers ») pour créer de la masse et générer des propriétés de fluidité et des caractéristiques de compression spécifique lors de la préparation de comprimés et de capsules (Gönül et al., 2000). Des exemples de ces agents diluants sont les sulfate de calcium, le lactose, le Néosorb® 20/60 (marque déposée de la Société ROQUETTE et Frères), le Tablettose® (marque déposée de la Société MEGGLE MILCH Industrie GMBH and Co.), le mannitol, le sorbitol ou le mélange lactose/PVP vendu sous la marque Ludipress® (Société BASF) (Cros, 1995).

### **3.5.3.4 L'amidon riche en amylose réticulé**

La réticulation de l'amidon est une technique connue depuis plusieurs dizaines d'années et son utilisation comme excipient pour la libération contrôlée date des années '90 (Mateescu et al., 1992). L'amidon riche en amylose réticulé est commercialement connu sous le nom de Contramid® (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1994). Les comprimés d'amidon réticulé préparés par compression directe présentent une matrice

polymérique à l'état vitreux. Au contact du milieu aqueux, cette matrice gonfle progressivement et libère graduellement le principe actif. La libération peut se produire sur une échelle de temps allant jusqu'à 24 h et les profils de libération obtenus sont plutôt linéaires que Fickiens ce qui veut dire que la libération n'est pas gouvernée par un processus de diffusion seulement (Lenaerts et al., 1991; Mulbacher et al., 2005). Il a été observé que pour une matrice à base d'amidon, le temps de libération du principe actif dépend de façon nonmonotone (atteint un maximum et diminue par la suite) du degré de réticulation (Fig 3.16 a et b) (Dumoulin et al., 1998a, Ispas-Szabo et al., 2000).

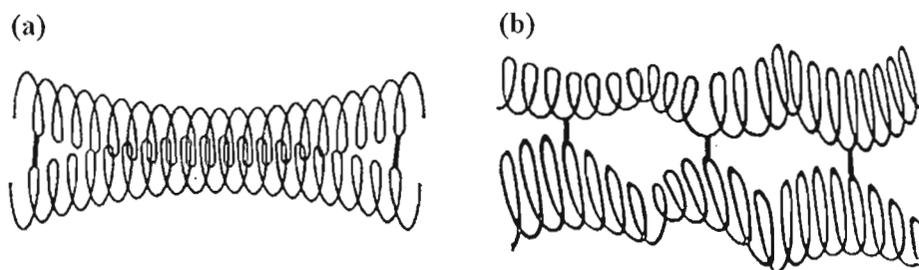


**Figure 3.16 :** Influence du degré de réticulation de l'amidon riche en amylose sur (a) le temps de libération du principe actif (b) la patron de diffraction aux rayons X (d'après (a) Dumoulin et al., 1998; (b) Ispas-Szabo et al., 2000).

Ces différences de comportement, en fonction du degré de réticulation, sont corrélées avec la capacité de gonflement de matrice d'amidon riche en amylose, réticulé (Ispas-Szabo et al., 2000, Dumoulin et al., 1998a). La réticulation va affecter le degré d'ordre au niveau du réseau cristallin en plus de générer un polymère plus articulé (Mateescu et al., 1994). Pour des degrés faibles de réticulation, une dominance des zones ordonnées (stabilisé par ponts hydrogènes) est observée au sein de la matrice empêchant le gonflement du comprimé lors de la pénétration de l'eau dans la structure (Fig 3.17 a).

Pour des degrés modérés de réticulation, les régions amorphes de la matrice polymérique sont plus étendues permettant une stabilisation de la structure lors du gonflement et une libération progressive du principe actif (Ispas-Szabo et al., 2000).

Lorsque le degré de réticulation est élevé, la stabilisation par ponts hydrogène entre les chaînes est empêchée (Fig 3.17 b). En effet, la distance séparant deux chaînes polymériques hautement réticulées est trop importante pour le maintien des ponts hydrogènes (Dumoulin et al., 1998a). La réticulation élevée génère un espacement des chaînes d'amylose et ainsi une mise à disposition des groupements hydroxyles pour hydratation. Par interaction de ceux-ci avec des molécules d'eau il y a un gonflement avancé de la matrice polymérique (Moussa et al., 1998), favorisant la destruction de la structure et la libération rapide du principe actif (Mateescu et al., 1992; Dumoulin et al., 1994; Moussa et Cartilier, 1996).



**Figure 3.17 :** Représentation hypothétique de la stabilisation par ponts hydrogènes de l'amylose (a) faiblement réticulé (b) hautement réticulé (Dumoulin et al., 1998a).

### 3.5.3.5 L'amylose réticulé pour la libération contrôlée enzymatiquement

Les matrices à base d'amylose peuvent être des substrats des amylases. Des substrats spécifiques sous forme de tablettes à base d'amylose réticulé ont été développés pour déterminer la concentration (activité) de l'alpha-amylase en se basant sur la formation de complexes entre l'iode et l'amylose (Mateescu et Schell, 1983; 1985;

Vălsănescu et al., 1985). Une formulation contenant un excipient à base d'amidon subit l'attaque enzymatique de l'alpha-amylase libérée par le pancréas au niveau du duodénum. Ce phénomène peut provoquer une libération du principe actif contrôlée par l'érosion enzymatique. Afin d'obtenir un contrôle sur la vitesse de libération de l'actif, l'introduction de l'alpha-amylase au sein de la matrice polymérique pour générer une érosion enzymatique interne a été proposée surtout pour des actifs avec une très faible vitesse de libération (Mateescu et al., 1992; Dumoulin et al., 1999). La pénétration de l'eau au sein du comprimé va initier le début de l'érosion enzymatique et de ce fait l'intégrité du comprimé est maintenue jusqu'à sa prise.

### **3.5.3.6 L'amidon réticulé et substitué**

Il a été montré que des comprimés à base d'amidon réticulé et substitué (par exemple par des groupements carboxyméthyl, aminoéthyl ou acétate) permettent une libération contrôlée du principe actif à partir de formulations hautement chargées en agent pharmaceutique (Mulbacher et al., 2001; Mateescu et al., 2006). Il a aussi été montré que des formulations à base d'amidon riche en amylose, réticulé et substitué sont caractérisées par une certaine mucoadhésion au niveau intestinal, au même titre que celle obtenue avec l'acide polyacrylique (Carbopol®) ou l'hydroxypropyl méthylcellulose (Mulbacher et al., 2006).

### **3.5.3.7 Le carboxyméthyl amidon comme excipient pharmaceutique**

La carboxyméthylation de l'amidon a été effectuée dans un premiers temps pour augmenter son hydrophilicité et de ce fait, faciliter la désagrégation du polymère dans l'eau (Société ROQUETTE et Frères). Une forme faiblement réticulée du carboxyméthyl amidon va par contre limiter la solubilité du polymère (Mulbacher et al., 2001; 2006; Shah et Augsburger, 2002). Le carboxyméthyl amidon sodique est un matériau largement utilisé dans le milieu pharmaceutique pour les formulations orales. Il peut

jouer le rôle d'agent désagrégant dans les comprimés. L'hydratation du polymère cause un gonflement considérable et une désagrégation rapide de la matrice permettant une libération rapide du principe actif renfermé. L'efficacité du carboxyméthyl amidon sodique n'est pas diminuée par la présence d'excipients hydrophobes tels que les lubrifiants ou des actifs non polaires permettant leur utilisation dans la plupart des formulations.

Lorsque le carboxyméthyl amidon est un constituant de la formulation, il peut conférer au comprimé des propriétés de gastro-protection et de livraison de principes bio-actifs au niveau intestinal. En effet, cette matrice va générer, en présence du fluide gastrique, une certaine protection du principe actif par protonation des groupements carboxyliques externes provoquant la formation d'un gel qui va retarder la pénétration du liquide à l'intérieur du comprimé. En présence du milieu intestinal, la libération du principe actif se fait de façon progressive suite à un gonflement et une érosion de la matrice polymérique (Calinescu et al., 2006; 2007). Une déprotonation des groupements carboxyliques peut avoir lieu en milieu alcalin par échange du proton pour l'ion sodium. Suite à cet échange, la matrice polymérique va s'hydrater et un gonflement du système en résulte. La pénétration du fluide intestinal au sein de la matrice polymérique va initier une érosion enzymatique, dépendante de l'activité de l'alpha-amylase libérée par le pancréas (Massicotte et al., 2008) ainsi que du degré de substitution (DS). Il a été montré que la masse du comprimé a une influence directe sur le temps de libération du principe actif par augmentation du mécanisme de diffusion de celui-ci au travers de la matrice polymérique (Brouillet et al., 2008).

Dernièrement, des matrices composées de carboxyméthyl amidon et de chitosane ont été testées avec comme résultats une gastro-protection de l'agent pharmaceutique et une libération retardée de celui-ci au niveau du colon (Calinescu et Mateescu, 2008). Ces propriétés peuvent être expliquées pour une stabilisation ionique entre les groupes amine du chitosane et les fonctions carboxyle du CMA.

## CHAPITRE IV

### PRÉSENTATION DU PROJET

#### Le contexte

Le concept d'immunité mucoale dans le cadre d'un procédé vaccinal implique une livraison de matériel antigénique correctement structuré et en quantité suffisante au niveau des sites d'induction. Une administration par voie orale est une possibilité pour atteindre la voie des muqueuses. Les conditions de pH et les conditions enzymatiques grâce auxquelles transite le bol alimentaire lors du parcours du tractus gastro-intestinal risquent fortement d'endommager le matériel antigénique. L'utilisation du CMA comme matrice capable d'assurer, dans une certaine mesure, une protection gastrique du matériel protéique formulé, ainsi qu'une libération de celui-ci au niveau intestinal, a été testée *in vitro* dans les conditions mimant celles du tractus gastro-intestinal.

#### Le projet

Le projet développé dans ce mémoire présente un nouvel aspect de l'utilisation du CMA étudié jusqu'à maintenant (Mulbacher et al., 2004; Calinescu et al., 2005; 2007; Massicotte et al., 2008). Le but du projet était d'évaluer si la matrice de CMA permettait de satisfaire aux exigences requises pour une immunisation mucoale avec l'utilisation de plantes transgéniques exprimant un antigène spécifique. Des extraits végétaux bruts ont été utilisés initialement comme matériel de base lors du procédé vaccinal. Des quantités importantes de matériel bioactif formulé avec cette matrice polymérique ont été utilisées afin de maximiser la probabilité de susciter une réponse de la part du système immunitaire commun aux muqueuses (SICM).

Dans un premier temps, la capacité de la matrice à protéger l'extrait végétal des dommages causés par les conditions de pH gastrique et de dégradation par la pepsine a été testée pour des formulations contenant 25 % en extraits bruts. Afin de pouvoir quantifier la conservation de l'intégrité d'une protéine d'intérêt, l'albumine sérique bovine (BSA) a été rajoutée à raison de 1 % dans l'extrait végétal. Par la suite, la libération des protéines végétales formulées a été suivie dans un milieu simulant les conditions intestinales (SIF). En présence de pancréatine, une destruction de la plupart de protéines végétales a été observée, de même que pour la libération de la BSA utilisée comme traceur. Suite à cette dégradation, un inhibiteur de protéases à sérine a été utilisé systématiquement, d'une part dans le milieu de libération et d'autre part dans la formulation. Dans le milieu de libération, l'utilisation des comprimés *Complete*™ distribués par la compagnie Roche a permis une évaluation des protéines libérées lors d'un test de chargement. Une charge du comprimé de 30% en extrait de protéines végétales a montré un profil de libération linéaire et une dissolution totale dans les 6 h. Par la suite deux catégories d'inhibiteurs de protéases, le Pefabloc SC (inhibiteur de nature chimique) et l'Aprotinine (inhibiteur de nature protéique) ont été testées à différentes concentrations dans le milieu de libération puis dans la formulation des comprimés. L'efficacité du Pefabloc SC à protéger les protéines végétales et la BSA de l'activité protéolytique de la pancréatine a ensuite été testée. Afin de donner une indication sur la conservation de la structure des protéines libérées, la lipase a été incorporée dans la formulation comme marqueur enzymatique. L'évaluation de son activité enzymatique au cours de la libération a été déterminée ainsi que la conservation de son activité au cours du temps en présence de pancréatine et du Pefabloc SC.

Le projet présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire d'Enzymologie et des Polymères Biocompatibles sous la direction du Pr. M.A. Mateescu et en collaboration avec les Laboratoires de Biologie Moléculaire et Biotechnologie du Pr D. Archambault (co-directeur) et de Biologie Végétale du Pr. F. Sarhan. L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce projet est présenté dans la figure 4.1.

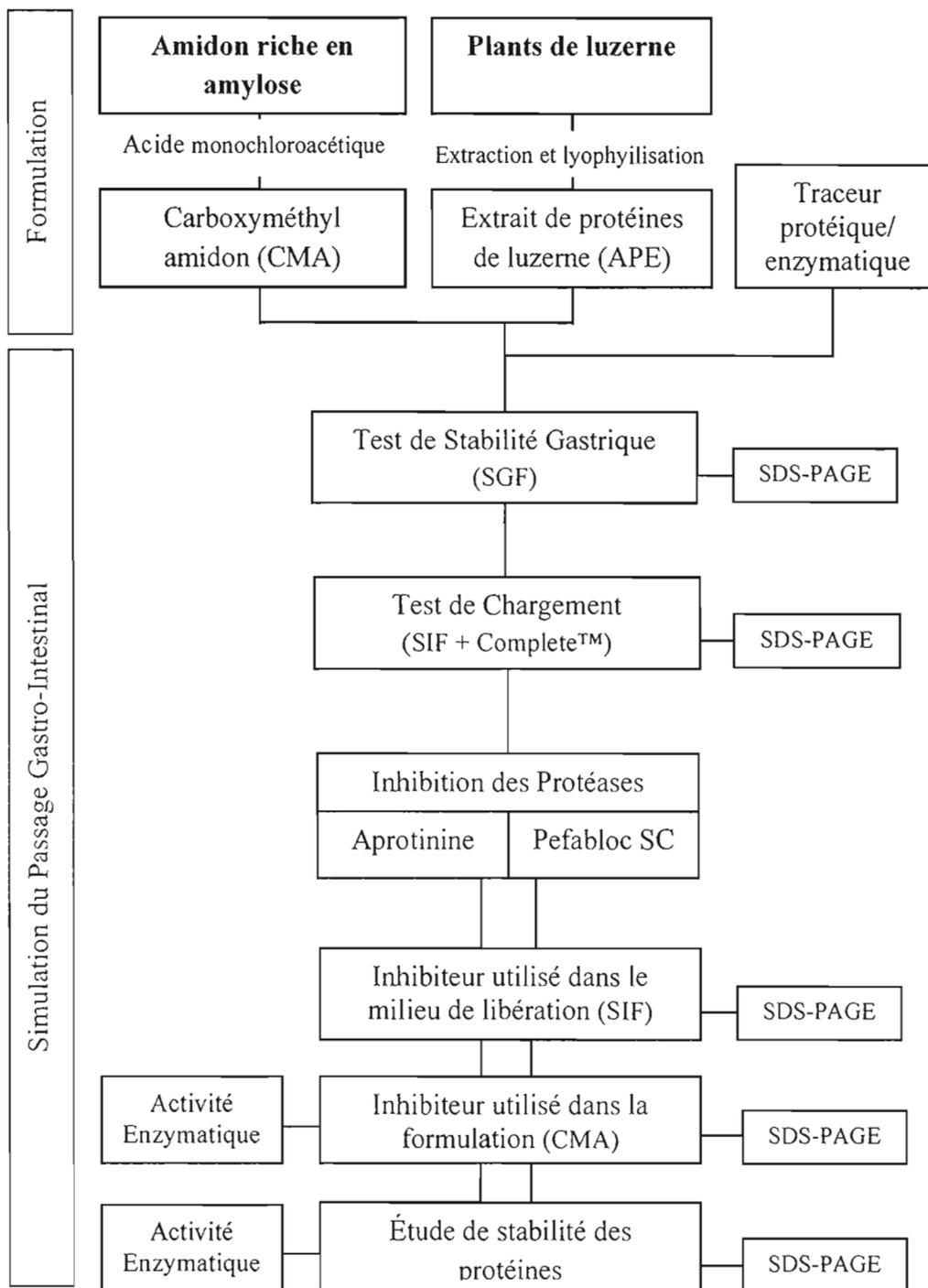


Figure 4.1 : Présentation schématique des différentes étapes du projet

**PARTIE II**  
**PARTIE EXPERIMENTALE**

## CHAPITRE V

### MANUSCRIT

Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par la  
voie orale avec des matrices à base de carboxyméthyl amidon  
contenant des inhibiteurs de protéases

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3,4,5</sup>, Francine Hamel<sup>1,2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup>  
and Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department de chimie,

<sup>2</sup> Department des sciences biologiques,

<sup>3</sup> Centre BioMed,

<sup>4</sup> Centre PharmaQAM.

Université du Québec à Montréal,

CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8

<sup>4</sup> Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal,

CP 5000, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada, J2S 7C6

\* Corresponding author

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

*E-mail address:* [mateescu.m-alexandru@uqam.ca](mailto:mateescu.m-alexandru@uqam.ca)

## Résumé

Le but de cette étude était de mettre au point une formulation, pour des agents bioactifs, à base de carboxyméthyl amidon contenant des inhibiteurs de protéases. Ce type de formulation confère une protection gastrique et une augmentation de la stabilité des principes bioactifs contre la dégradation par les enzymes pancréatiques. Ce niveau de protection est requis dans le cadre d'une vaccination par voie orale via l'utilisation d'antigènes spécifiques. Le Pefabloc SC et l'aprotinine ont été testés, dans le milieu de libération ou dans la formulation, pour contrer la dégradation du matériel bioactif libéré. Les résultats ont montré, pour une formulation à base de carboxyméthyl amidon chargée à 30% (w/w) en extrait de luzerne et 1.6 % (w/w) en Pefabloc SC, une protection de 98 % des protéines végétales. Pour le BSA, utilisé comme marqueur protéique, une protection de 90 % est générée par cette formulation. Afin d'évaluer la conservation de la structure et la stabilité des protéines dans la formulation, la lipase a été utilisée comme marqueur enzymatique. Les résultats obtenus ont montré une activité enzymatique plus importante dans le milieu de libération, pour les formulations de protéines végétales contenant du Pefabloc SC. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans la formulation confère une meilleure protection de la structure des protéines formulées.

**Mots clés :** carboxyméthyl amidon, luzerne, vaccin, voie orale, comprimé, stabilité gastrique et intestinale, inhibiteur de protéases.

Research paper

Carboxymethyl-Starch excipients for gastrointestinal  
stable oral protein formulations  
containing protease inhibitors

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3,4,5</sup>, Francine Hamel<sup>1,2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup>  
and Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry,

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences,

<sup>3</sup> Centre BioMed,

<sup>4</sup> Centre PharmaQAM.

Université du Québec à Montréal,

CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8

<sup>4</sup> Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal,

CP 5000, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada, J2S 7C6

\* Corresponding author

Tel.: +1 514 987 4319

Fax: +1 514 987 4054

*E-mail address:* [mateescu.m-alexandru@uqam.ca](mailto:mateescu.m-alexandru@uqam.ca)

## ABSTRACT

**Purpose.** The aim of this study was to develop a formulation for bioactive compounds using Carboxymethyl Starch (CMS) as excipient containing protease inhibitors. This formulation provided gastro protection and enhanced stability against pancreatic enzymes. Such stability is needed for formulation of oral vaccines with specific antigens. **Methods.** CMS was synthesized by treatment of starch with monochloroacetic acid in conditions leading to a substitution degree of about 1 meq/g and used as excipient for monolithic devices (300 mg tablets). Pefabloc SC and Aprotinin inhibitors were tested in dissolution media and in formulation to prevent the degradation of released bioactive materials. To evaluate the structural integrity and biological stability of plant proteins in the CMS formulation, albumin and lipase were added to the plant protein extract as protein and respectively as enzyme markers. The amounts of released and recovered proteins were evaluated by SDS-PAGE and densitometric analysis. **Results.** It was found that 1.6 % (w/w) of Pefabloc SC provides 98 % protection of the released plant proteins for formulations of 30 % alfalfa protein extract (APE) with CMS. In addition, when bovine serum albumin (BSA) added to the plant protein extract as a marker, 90 % protection of the released BSA was observed. Furthermore, a much higher lipase activity was found in the releasing media when the formulations contained Pefabloc SC. **Conclusion.** Formulations with CM-Starch excipients and containing protease inhibitors prevent protein degradation and protect lipase activity, showing a marked potential to use for orally administered bioactive peptides and therapeutic enzymes.

**Novelty of the work**

1. To our knowledge, this is the first report showing protease inhibitors added to the formulation to protect plant proteins from proteolytic degradation by pancreatic enzymes. 2. The CMS matrix can protect plant protein extract from the gastric acidity and digestive proteolysis (pepsin, trypsin, chymotrypsin) formulated without any coating, allowing the release of the bio-active material within 6 h for various intestinal targets. Consequently, the bioactive materials formulated with CMS matrix and protease inhibitors are released in intervals fitting well with the small intestine transit and maintain their structural and functional properties. These properties are important for formulation of bioactive compounds targeted to mucosal immunity.

**1. INTRODUCTION**

The development of mucosal vaccines for the prevention of infectious diseases has recently attracted a growing interest. This approach requires antigen with or without adjuvant that can be efficiently delivered to the mucosal immune system (1). Plants can easily be genetically transformed with genes of interest and provide an inexpensive source of proteins and other compounds that can act as bacterial and viral antigens (2). Tobacco, soya, potato and alfalfa have a strong regenerative capacity to produce large populations and high biomass within a relatively short period of time (3). The low levels of secondary metabolites and high protein content in the leaves of alfalfa plant make it an ideal bioreactor for the production of recombinant proteins (4).

Most infections occur or begin at the level of digestive or respiratory mucosal surfaces. Therefore, administration of a vaccine at those sites is expected to induce a mucosal protective immune response. The oral vaccines are characterized by M cell-mediated antigen uptake associated with the development of a sIgA (secretory immunoglobulin type A) response around the inductive sites (5). The sIgA prevent interactions between pathogens and mucosal receptors at the surface of intestinal cells.

Moreover, oral vaccines can also act via the so-called mucosal immune system, which allows protection at distant mucosal sites (6). Thus using the mucosal route of vaccination has several major advantages versus the parenteral way.

To develop this approach, a suitable system that ensures protection of orally-administrated immunogenic proteins from the acidic gastric environment is required. In addition, the antigens must also be protected against enzymatic degradation in the small intestine, the site of the immune response (7). High Amylose Starch with more than 70 % amylose and less than 30 % amylopectin is largely used in pharmaceuticals as filler, binder and disintegrant (8). Recently, carboxymethyl starch (CMS) was introduced as excipient for drug delivery to protect bioactive compounds against gastric acidity (9,10). In acidic media, carboxylic groups become protonated and compact, limiting surrounding acidity and pepsin to penetrate inside the matrix. In neutral or weak alkaline media, protons are changed to sodium cations which hydrate, inducing swelling and dissolution of the matrix that can occur at the same time as erosion (11,12). A formulation consisting of carboxymethyl high amylose starch supplemented with NaCl was described for sustained drug release (13).

The presence of pancreatin (with alpha-amylase enzymatic activity) in simulated intestinal fluid (SIF) significantly increases the erosion rate of the modified starch (12). Pancreatic secretions also contain non-specific serine proteases (trypsin, chymotrypsin) that can damage the released proteins from orally administered dosage forms. To prevent this, serine protease inhibitors such as Aprotinin and Pefabloc SC may be added to the tablet formulation (14).

Aprotinin is a reversible pancreatic protease inhibitor of bovine origin with a broad inhibitory specificity extended to trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikrein (15,16). In addition, due to its low toxicity and strong inhibition of lumenally secreted and brush-border membrane-bound proteases, aprotinin has already been used associated

to orally administered therapeutic peptides and proteins (17,18), in order to prevent proteolytic digestion. Pefabloc SC or AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) is a sulfonyl fluoride irreversible protease inhibitor with negligible toxicity compared to phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF) and 4-Aminophenyl-methylsulphonyl fluoride (APMSF). It is also hydrolyzed slowly under weak alkaline conditions (pH 8-9) (19). Pefabloc SC has already been used in the oral formulation of hexarelin, a hexapeptide with growth hormone-releasing activity, to protect it from pancreatic proteases (20).

In this report, we describe the development of an efficient formulation using CMS including protease inhibitors as a plant-derived protein delivery system. The developed formulation provides gastric and intestinal peptides stability, two essential conditions to administer therapeutic proteins or bioactive agents such as antigen for mucosal immunity in oral vaccination.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Materials**

High amylose corn starch (Hylon VII) was from National Starch (Bridgewater, NJ, USA). The Pepsin A from porcine gastric mucosa, the bovine serum albumin (BSA) and the microbial Lipase from *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3, with 1180 units/mg solid) were obtained from Sigma-Aldrich Company (St-Louis, MO, USA). Pancreatin (porcine pancreas) eight times strength (with alpha-amylase, lipase, proteolytic activities) was from A&C American Chemicals Ltd. (Montreal, Qc, Canada). The acrylamide, the N,N'-methylene-bis-acrylamide, and the protein molecular weight marker (Broad Range) were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA). The Aprotinin, the *Complete*<sup>™</sup> tablets and the Pefabloc SC were from Roche Diagnostics (Laval, Qc, Canada).

## 2.2. Carboxymethyl starch synthesis

The excipient was obtained by semisynthesis as described by Schell et al. (21) and Calinescu et al. (10) with slight modifications. Briefly, 140 g of Hylon VII was suspended in 300 mL of H<sub>2</sub>O and warmed at 50 °C under continuous stirring in a Hobart planetary mixer. A volume of 400 mL of 1.5 M NaOH was slowly added and the reaction medium was homogenized for 20 min at 50 °C. Subsequently, 110 mL of 10 M NaOH solution and 90 g of monochloroacetic acid (dissolved in a minimum volume of water) were immediately added to the mixture and stirred for 80 min at 50 °C. At the end of the reaction, the mixture was neutralized with 300 mL of 2.33 M acetic acid and cooled at room temperature. Salt ions were removed by washing the slurry with a solution of acetone:water (60:40 v/v) repeating three times filtration and resuspension. The slurry was then precipitated with pure acetone and filtered through Whatman filter paper. The recovered CMS polymeric material was dried overnight at room temperature and then sieved, to retain the powder with particles smaller than 300 µm.

The degree of substitution (DS) of the CMS was determined by potentiometric titration and expressed in milliequivalents of functional groups per gram of polymeric powder (meq/g). The carboxymethyl groups of the derivative were first activated by conversion into the acidic (protonated) form. Briefly, 1.5 g of polymer was suspended in 40 mL 0.1 M HCl solution for 20 min under stirring. The slurry was thoroughly washed with acetone:water (70:30, v/v) to eliminate HCl excess, then with pure acetone, filtered and dried as above. An amount of 1 g was suspended in 50 mL H<sub>2</sub>O and titrated with 0.2 M NaOH solution. The obtained value was converted into DS expressed in meq/g giving a value of 0.92 meq/g.

### **2.3. Total protein extract**

The aerial parts of eight weeks grown alfalfa [*Medicago Sativa L.*] plants were collected, and ground in liquid nitrogen. The hydrated powder was kept overnight at –80 °C and freeze dried (Freeze Mobile 24, The Virtis Company Inc., Gardiner, NY, USA) during 5 days. Dried alfalfa protein extract (APE) were kept at -20 °C.

### **2.4. Protein extract formulation by direct compression**

The 300 mg CMS tablets (9 mm diameter, 3.3 mm thickness) were produced by direct compression using Carver hydraulic press (Carver inc., Wabash, IN, USA) at 2.5 T of mixed dry powders of CMS and various amounts of APE containing or not BSA 1% (w/w) or Lipase 1% (w/w) as markers. Protease inhibitors, Aprotinin or Pefabloc SC, were integrated into the excipient at various loading for the tablets preparation. No other components or enteric coating were added to the formulation.

### **2.5. Stability of alfalfa proteins, BSA and Lipase in simulated gastric fluid (SGF)**

Samples of alfalfa protein extract (APE), APE supplemented with BSA 1 % (w/w), or APE supplemented with Lipase 1 % (w/w) were individually incubated in 10 mL of acidic SGF (HCl 0.26 %, NaCl 0.2 %, pH 1.2) pepsin-free or containing 0.32 % pepsin, 1.17 U/mg (USP, 1990) for 60 and 120 min under gentle rotation at 50 rpm and 37 °C. At the end of the incubation period, samples of 200 µL of the acidic solution were precipitated with cold acetone (1:5 v/v) and the stability of the alfalfa proteins and BSA checked using SDS-PAGE electrophoresis and quantified by Integrated Optic Density (IOD). The activity of the free Lipase in these conditions was determined using samples of 200 µL withdrawn after each hour of incubation. The enzymatic activity was stopped with liquid nitrogen.

Tablets (300 mg) of CMS containing 25 % of APE, APE with BSA 1% (w/w) or APE with Lipase 1% (w/w) were incubated under the conditions described above before being transferred into 10 mL of PBS solution for total dissolution under gentle agitation at 4 °C. The integrity of the protein content in these formulations was evaluated for alfalfa proteins, BSA and Lipase by SDS-PAGE and measurement of enzymatic activity.

## **2.6. Delivery of formulated alfalfa proteins, BSA and Lipase in simulated intestinal fluid (SIF)**

Tablets of APE, APE with BSA 1% (w/w) or APE with Lipase 1% (w/w) formulated with CMS were incubated for 2 h in 10 mL of SGF containing 0.32 % pepsin (pH 1.2) and then transferred for 6 h in 10 mL of SIF (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.68 %, NaOH 0.0615 %, pH 6.8), with or without 8 X pancreatin, 0.125 % (USP, 1990) at 50 rpm and 37 °C. Released proteins were withdrawn every hour and evaluated by SDS-PAGE. The enzymatic degradation of the released protein was stopped with cold acetone (1:5 v/v).

## **2.7. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

The degradation state of alfalfa proteins, BSA and Lipase was evaluated using SDS-PAGE. Samples of 200 µL of the dissolution media were collected during the incubation in SGF or dissolution in SIF and precipitated with cold acetone (1:5 v/v), kept at -20°C during at least 6 h, and then centrifuged, dried, and resuspended in 75 µL of PBS. A volume of 75 µL of electrophoresis loading buffer (0.12 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20 % glycerol, 10 % β-mercaptoethanol and 0.004% bromophenol blue) was added to each sample and then heated for 2 min at 95°C. A volume of 15 µL of each samples was loaded onto a 12 % polyacrylamide gel and run at room temperature for 1.5 h (120 V Bio-Rad™ power supply) using an electrophoresis running buffer (0.025 M Tris-Base pH 8.3 containing 0.192 M glycine and 0.1 % SDS). Molecular weight protein

markers (Broad Range) were loaded as reference. Proteins were stained with R-250 Coomassie blue and gels were dried between cellulose sheets.

### **2.8. Densitometric analysis**

Densitometry was carried out using the Quantity One 1-D Analysis program (Bio-Rad™). For each band, the program evaluated the surface ( $\text{mm}^2$ ) and multiplied by its corresponding measured density to obtain the integrated optic density (IOD). The percentages of variation in the band densities for each sample compared to those of the standard (free or formulated APE or APE with BSA (1%) in PBS at time zero) set at 100 % were determined.

### **2.9. Determination of Lipase activity**

Lipase activity was determined as described by Cherry and Crandall procedure (USP, 1990), using an emulsion of olive oil as substrate. Briefly, 4.5 mL olive oil, 18 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mL of 0.2 M Trizma Buffer (pH 7.7), 2.5 g Arabic gum, 1 mL of a solution containing 0.015 M  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 M NaCl and 0.011 M Sodium taurodeoxycholate were incorporated in the emulsion by ultrasonication with a Vibra cell sonicator (Sonic Materials Inc., Danbury, CT, USA). A volume of 2.5 mL of emulsion was incubated for 2 h at 37 °C with 200  $\mu\text{L}$  of enzyme sample solution. Two drops of thymolphthalein 0.9 % (w/v) pH indicator were added to the emulsion and the Lipase enzymatic activity was determined by titration of the produced oleic acid with 0.2 M NaOH until the solution turned into a light blue color.

## **3. RESULTS**

Both alfalfa proteins and BSA, used as a marker, were protected against gastric acidity and pepsinolytic conditions when formulated with CMS. The SDS-PAGE

showed more than 90 % of protection after 1-2 h (37 °C and 50 rpm) of incubation in SGF with or without pepsin (Figure 1a, b, lanes 7-10, and c). Free alfalfa proteins and free BSA showed pH sensibility with a 30% loss after 1 or 2 h of incubation in SGF without pepsin (Figure 1a, b, lanes 3 and 5, and c). In SGF with pepsin, free alfalfa proteins and BSA were almost completely degraded after the same times of incubation (Figure 1a, b, lanes 4 and 6, and c).

The CMS tablets containing APE and APE with BSA (1 % w/w) showed a slow release of proteins in SIF in absence of the pancreatic enzymes (Figure 2a, b). Pancreatin contains alpha-amylase, lipase and important proteolytic activities related mainly to serine proteases such as trypsin and chymotrypsin. Because of the susceptibility of alfalfa proteins and of BSA to proteolytic degradation, very low levels of proteins were observed on SDS-PAGE gels when pancreatin was present in the SIF (Figure 2a, b). To determine the release kinetics of the formulated proteins in SIF with pancreatin, *Complete*<sup>™</sup> tablets containing protease inhibitor were added to the dissolution media. This dissolved inhibitor prevents the proteolytic activity, allowing the release of plant proteins and of BSA in pancreatic conditions without noticeable degradation.

Our current formulations were loaded with 25 % of APE with or without marker. As formulations loaded with more plant proteins are expected to enhance the immune response, the release curves from CMS tablets loaded with 20 %, 30 %, 40 % and 50 % of APE or APE with BSA marker, in SIF containing pancreatin and protease inhibitor dissolved from the *Complete*<sup>™</sup> tablets were evaluated. The results in Fig 2c and d showed that formulations loaded with 20 and 30 % released 100 % of proteins in 4-5 h, a period compatible with the time necessary for an orally-administrated immunogenic agent to reach the small intestine where the immune response is initiated. The formulations loaded with 40 and 50 % showed, over a 6 h period, a release of 75 to 55 % for the plant proteins and 65 to 60 % for the BSA marker, respectively. It appears that increased loading with APE generates more compact structures after compression. Thus

the loading with 30 % that allowed total release of APE or of APE + BSA marker in 4-5 h was used for the remainder of the study.

The delivery of alfalfa proteins in SIF containing pancreatin and 0.015 % or 0.030 % (w/v) Aprotinin showed 50 % protection for both concentrations of the inhibitor (Figure 3a). In contrast, only 15 % of BSA was recovered for both Aprotinin concentrations in the dissolution media (Figure 3b). Under 0.025 % or 0.050 % (w/v) Pefabloc SC (concentration comparable or twice higher than those released by *Complete*<sup>™</sup> tablets) in the SIF, 100 % protection of APE was achieved at the end of the incubation (Figure 3a). For the BSA marker, similar protection with 100 % recovery was obtained for both concentrations of Pefabloc SC (Figure 3b). Indeed, for both alfalfa proteins and BSA, 0.025 % (w/v) of Pefabloc SC in SIF was sufficient to afford protection similar to that obtained with *Complete*<sup>™</sup> tablets (one per each dissolution medium) (Figure 2a and b). As control, no protein recovery was observed in the absence of protease inhibitors in the SIF (Figure 2 a, b and Figure 3).

To appropriately deliver immunogens to specific immune sites along the small intestine, a combined formulation allowing a simultaneous release of proteins and the inhibition of serine proteases was tested by incorporating Aprotinin or Pefabloc SC into the polymeric excipient. The delivery of proteins from formulations loaded with 30 % APE and 0.5 % or 1.0 % (w/w) of Aprotinin was assessed in SIF containing pancreatin. Recoveries of 55 % or 60 % of released alfalfa proteins (Figure 4a) and of 10 % or 15 % of released BSA marker (Figure 4b) were observed, respectively.

When Pefabloc SC was used in the formulation, lesser degradation of the released alfalfa proteins was observed. Indeed, recovery rates of 70 %, 80 % or 95 % of proteins in SIF were observed when the tablets contained 0.8 %, 1.2 % or 1.6 % (w/w) of Pefabloc SC (Figure 4a). Furthermore, for the tablet containing 1.6 % (w/w) of Pefabloc SC, the alfalfa proteins release profiles were similar to those obtained with the

Pefabloc SC added in the dissolution medium (Figure 3a). In contrast, BSA appeared to be more susceptible to proteolysis. This degradation was prevented by the Pefabloc SC content of the formulation in a concentration-dependent manner. Thus, for tablets containing 0.8 or 1.2 % (w/w) of Pefabloc SC, a good recovery of 55 or 70 % of BSA were respectively found in the release medium. When 1.6 % (w/w) of Pefabloc SC was used in the formulation, the protection was even higher, with 90 % of the BSA recovered in the dissolution medium at the end of the release process (Figure 4b).

To validate the stability of the alfalfa proteins and BSA in the presence of protease inhibitors, non-formulated free proteins were incubated during 6 h (37 °C and 50 rpm) in SIF with pancreatin and 2.5 mg of Pefabloc SC added to the incubation medium. It was found that the electrophoretic pattern of Alfalfa proteins and BSA remained unchanged throughout the 6 h treatment with pancreatic enzymes (Figure 5a and b, lanes 4-10). This indicates that Pefabloc SC provides enough protection to ensure structural stability (Figure 5c).

To determine the stability of enzymatic activity, APE with Lipase 1 % (w/w) as marker was incubated during 6 h (37 °C and 50 rpm) in SIF containing pancreatin, with or without 2.5 mg of Pefabloc SC in the media. Higher lipase activity was observed in the presence of Pefabloc SC when compared to the media with no inhibitors (Figure 6a). Thus, the delivery of proteins in SIF containing pancreatin from tablets loaded with 30 % APE with Lipase 1 % (w/w), with or without Pefabloc SC (1.6 % w/w) in the formulation, was evaluated over time. After 6 h of releasing, the lipase activity in dissolution media from tablets containing Pefabloc SC was 30% higher than from those without protease inhibitors (Figure 6b).

#### 4. DISCUSSION

Since most proteins are sensitive to digestive proteolysis (pepsin, pancreatic proteases), their immunogenicity in the context of oral vaccines may be damaged and the immune response at mucosal sites may be compromised. Thus, a formulation providing good protection, not only from gastric but also from intestinal proteolysis, is needed to maintain their immunogenic and therapeutic properties. The CMA has been shown to exert certain stability in gastric condition due to its pH sensitive properties (10-12). In intestinal conditions, when small molecules are formulated, the CMA provides a progressive release of the bioactive agent. This is probably due to pancreatic alpha-amylase that acts on CMS as substrate.

The protein release was faster in SIF containing pancreatin than in SIF without enzymes, probably due to erosion of the CMS matrix (12). The increased release rate, in the presence of pancreatic enzymes, may be related to the fact that starch substituted with CM-groups is still an alpha-amylase substrate (11). Consequently, the erosion of the polymeric matrix, in concert with deprotonation of CM- groups in neutral pH, can accelerate the release of the protein content. Furthermore, it is known that proteins are often stabilized by associative interactions (ionic and hydrogen associations, Van der Waals forces). The fact that at lower bioactive principle loading (more CMS excipient in the tablet) the protein release was faster, suggests that CMS excipient could also act as a desintegrant.

In the case of peptides or therapeutic proteins with intestinal or colonic targeting, the pancreatic proteases (trypsin and chymotrypsin) and other intestinal proteases can damage the bioactive molecules. To circumvent this problem, a protease inhibitor was added to the formulated peptides in order to ensure intestinal stability of bioactive peptides when released from CMS formulation. To our knowledge, this is the first attempt to use a proteases inhibitor within the formulation. This approach differs from

the associated treatment with inhibitors which are separately delivered in the dissolution fluid (16). In our study, the release *in situ* of inhibitor together with the bioactive agent will increase local efficiency and avoid its non specific dissipation.

There are several commercial CMS based products, but they are cross-linked and used as desintegrants (22). Their action resides in the capacity of CMS to disintegrate, particularly at neutral pH (higher than pKa 4.2 of CMS) when carboxylic groups ionically retain  $\text{Na}^+$  and consequently hydrate, swell, and induce disintegration. The additional cross linking of these starch excipients (22) reduces the flexibility of chains and prevents further stabilisation by hydrogen association (12) involving carboxylic and hydroxylic groups. Thus, also the hydroxyl groups are free and available to hydrate, swell and induce desintegration. In our case, with the noncross-linked CMS, there is an interesting balance between the important hydration and swelling of carboxylate groups and the chain stabilisation by hydrogen bounding.

In plant protein formulation, particularly following compression, it is also possible to establish ionic interactions that involve the free amino group from lysine and carboxylic groups from formulated proteins (glutamate and aspartate) and that of CMS excipient. Since proteins can be digested by pancreatic proteolytic enzymes, the delivery of protease-sensitive proteins into the small intestine, without structural and functional damages, constitutes a challenge. An interesting way to prevent protein degradation is the use of protease inhibitors. Larionova et al. (16) used Aprotinin (a reversible serine protease inhibitor) in formulations to prevent proteolytic degradation of bioactive peptides for intestinal delivery. On the other hand, the active agent Pefabloc SC irreversible serine protease inhibitor has already been included in *Complete*<sup>TM</sup> tablets as commercial product. We have compared Aprotinin and Pefabloc SC as protease inhibitors in the dissolution media. Furthermore, we have introduced inhibitors to our CMS formulations. This is different from the previous approach using separate inhibitor administration.

Structural integrity and biological functionality of the immunogenic proteins are important to induce an adequate immune response. To address this point, lipase was added to APE as a model tracer and its enzymatic activity was evaluated. Higher lipase activity was observed in the presence of Pefabloc SC when compared to the media without inhibitors.

The interest of using oral vaccination consists not only in efficient local protection by secreted antibodies, but also in the fact that the formulations are easier to develop (less requirements of sterile conditions) and expected to be faster accepted by regulatory organisations.

In conclusion, our study demonstrates the feasibility to deliver stable bioactive proteins into intestinal environment using CMS excipients supplemented with serine proteases inhibitors. In addition to its protective role, the CMS excipient allows the release of the bioactive agents in less than 6 h, fitting well with the upper intestinal transit. Future work will focus on the application of these gastro-intestinal resistant formulations in vivo in the context of oral vaccine purposes.

### **Acknowledgements**

This work was supported by funds from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (strategic grant # 322085) to D. Archambault (PI), F. Sarhan and M. A. Mateescu, and from “La Fédération des Producteurs de Porcs du Québec” (FPPQ), and “Le Conseil pour le Développement de l’Agriculture du Québec” (CDAQ) to D. Archambault. A graduate studentship to P. De Koninck by “Le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal” is gratefully acknowledged.

**Abbreviations:** CM, carboxymethyl; CMS, Carboxymethyl Starch; DS, Degree of Substitution; SGF, Simulated Gastric Fluid; SIF, Simulated Intestinal Fluid; APE, Alfalfa Protein Extract; BSA, Bovine Serum Albumin; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; PBS, Phosphate Buffer Saline solution; IOD, Integrated Optic Density.

## REFERENCES

1. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, 2003; 21 : S2/89-S2/95.
2. Huang Z, Dry I, Webster D, Struynell R, Wesselingh S. Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 2001; 19 : 2163-2171.
3. Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, Barker DK, Poage ML, Mayor JM, Lamphear BJ, Drees CF, Jilka JM, Hood EE, Howard JA. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine*, 2003; 21 : 812-815.
4. Erickson, L.; Yu, W.J.; Brandle, J.; Rymerson, R., *Molecular Farming of Plants and Animals for Human and Veterinary Medicine*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 2002.
5. Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl J-P, Perringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Sciences*, 1997; 277 : 949-952.

6. Ogra PL, Faden H, Welliver RC. Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev*, 2001; 14 : 430-445.
7. Langguth P, Bohner V, Heizmann J, Merkle HP, Wolffram S, Amidon GL, Yamashita S. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J Control Release*, 1997; 46 : 39-57.
8. Roper H. Applications of starch and its derivatives, *Carbohydr Eur*, 2001; 15 : 14-21.
9. Mulhbacher J, Ispas-Szabo P, Mateescu MA. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study. *Int J Pharm*, 2004; 278 : 231-238.
10. Calinescu C, Mulhbacher J, Nadeau E, Fairbrother JM, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005; 60 : 53-60.
11. Calinescu C, Nadeau E, Mulhbacher J, Fairbrother JM, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastroresistant oral formulations. *Int J Pharm*, 2007; 343 : 18-25.
12. Massicotte LP, Baille WE, Mateescu MA. Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients: Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. *Int J Pharm*, 2008; 356 : 212-223.
13. Brouillet F, Bataille B, Cartilier L. High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: formulation aspects and in vitro drug-release evaluation. *Int J Pharm*, 2008; 356 : 52-60.

14. Esposito E, Cortesi R, Bortolotti F, Manegatti E, Nastruzzi C. Production and characterisation of biodegradable microparticles for the controlled delivery of proteinase inhibitors. *Int J Pharm*, 1996; 129 : 263-273.
15. Shi C, Zhao X, Wang X, Zhao L, Andersson R. Potential effects of PKC or protease inhibitors on acute pancreatitis-induced tissue injury in rats. *Vascul Pharmacol*, 2007; 46 : 406-411.
16. Larionova NV, Ponchel G, Duchêne D, Larionova NI. Biodegradable cross-linked starch:protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein administration. *Int J Pharm*, 1999; 189 : 171-178.
17. Yamamoto A, Taniguchi T, Rikyuu K, Tsuji T, Fujita T, Murakami M, Muranishi S. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm Res*, 1994; 11 : 1496-1500.
18. Tiourina, O., Hamdi, G., Larionova, N., Duchene, D., Ponchel, G., Preparation and characterization of polymethacryloyl starch microspheres loaded with basic pancreatic trypsin inhibitor. *Proc. 2nd World Meeting Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Paris, pp. 539–540, 1998.
19. Dentan C, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Pefabloc, 4-[2 aminoethyl]-benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta*, 1996; 1299 : 353-357.
20. Westberg C, Benkestock K, Fatouros A, Svensson M, Sjostrom B. Hexarelin–evaluation of factors influencing oral bioavailability and ways to improve absorption. *J Pharm Pharmacol*, 2001; 53 : 1257-1264.

21. Schell HD, Serban M, Mateescu MA, Bentia T. Acid and basic amylose ionic exchangers. *Rev Roumaine Chim*, 1978; 23 : 1143-1147.
  
22. Zhao N, Augsburger LL. Functionality Comparison of 3 Classes of Superdisintegrants in Promoting Aspirin Tablet Disintegration and Dissolution. *AAPS PharmSciTech*, 2005; 6 : E634-E640.

## Figure legends

**Fig. 1.** Stability of free or CMS-protected proteins in simulated gastric fluid (SGF/USP): in (a) SDS-PAGE pattern of alfalfa proteins; in (b) SDS-PAGE of BSA marker (1 %) in alfalfa protein extract (APE); (c) Densitometry analysis of SDS-PAGE based on IOD. Electrophoretic profiles: molecular weight of protein markers (kDa) (lane 1); Pepsin in simulated gastric fluid (lane 2); Free (non-formulated) proteins in SGF (without pepsin) after 1 h (lane 3) and 2 h (lane 5); Free proteins in SGF with pepsin after 1 h (lane 4) and 2 h (lane 6); Proteins formulated with CMS (tablets) after incubations time of 1 h (lane 7) and 2 h (lane 9) in SGF without pepsin, and 1 h (lane 8) and 2 h (lane 10) in SGF with pepsin. Volume of the samples: 15  $\mu$ L/well; IOD, integrated optic density (n=3).

**Fig. 2.** Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF/USP). The tablets (300 mg) containing 25 % of (a) alfalfa protein extract (APE) or (b) APE with BSA marker (1%), or loading of (c) 20 to 50 % APE or (d) 20 to 50 % APE with BSA (1%) were incubated (37 °C and 50 rpm) for 2 h in 10 mL of simulated gastric fluid containing pepsin (SGF/USP). Then they were transferred to (a) and (b) 10 mL of SIF without enzymes, SIF with pancreatin and SIF with pancreatin and proteases inhibitor (*Complete*<sup>™</sup> tablets) or to (c) and (d) SIF with pancreatin and SIF with pancreatin and proteases inhibitor (*Complete*<sup>™</sup> tablets). The samples were withdrawn every hour for 6 h and protein stability was determined by SDS-PAGE. Volume of the samples: 10  $\mu$ L/well; IOD, integrated optic density (n=3).

**Fig. 3.** Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF/USP) with protease inhibitor in dissolution media. The tablets (300 mg) loaded with 30 % of (a) APE or (b) APE + BSA (1%), were incubated (37 °C and 50 rpm) for 2 h in 10 mL of simulated gastric fluid containing pepsin (SGF/USP) and then transferred to 10 mL of SIF with pancreatin supplemented or not with Aprotinin (0.015 % or 0.030 % w/v) or Pefabloc SC (0.025 % or 0.050 % w/v). The samples were withdrawn every hour for 6 h and proteins stability was determined by SDS-PAGE. Volume of the samples: 10  $\mu$ L/well; IOD, integrated optic density (n=3).

**Fig. 4.** Release of proteins from CMS tablets in simulated intestinal fluid (SIF/USP) with protease inhibitor included in formulation. The tablets (300 mg) with or without Pefabloc SC (1.6 %, 1.2 % or 0.8 % w/w) or Aprotinin (0.5 % or 1.0 % w/w) and with at 30 % of (a) APE or (b) APE+ BSA (1%), were incubated (37 °C and 50 rpm) for 2 h in 10 mL of simulated gastric fluid containing pepsin (SGF/USP) and then transferred to 10 mL of SIF with pancreatin. The samples were withdrawn every hour for 6 h and protein stability was determined by SDS-PAGE. Volume of the samples: 10  $\mu$ L/well; IOD, integrated optic density (n=3).

**Fig. 5.** Stability of proteins in simulated intestinal fluid (SIF/USP) containing pancreatin and protease inhibitor (Pefabloc SC): (a) SDS-PAGE pattern of alfalfa proteins; (b) SDS-PAGE of BSA tracer (1%) in alfalfa protein extract (APE); (c) Densitometry analysis of SDS-PAGE based on IOD. Electrophoretic profiles: molecular weight of protein markers (kDa) (lane 1); Free (non-formulated) proteins in phosphate buffer solution (lane 2); Pancreatin in simulated intestinal fluid (lane 3); free (non-formulated) proteins in SIF with pancreatin and Pefabloc SC (0.025 % (w/v)) after 0 h (lane 4), 1 h (lane 5), 2 h (6), 3 h (7), 4 h (8), 5 h (9), 6 h (10). Volume of the samples: 10  $\mu$ L/well; IOD, integrated optic density (n=3).

**Fig. 6.** Lipase as a marker for protein formulation: (a) Lipase activity in simulated intestinal fluid (SIF/USP) from free (non-formulated) APE containing lipase (1%) incubated in SIF with pancreatin and with or without Pefabloc SC (0.025 % w/v). (b) Lipase activity from CMS tablets (300 mg) loaded with 30 % of APE with Lipase (1%) containing or not Pefabloc SC (0.050 % w/w), were incubated (37 °C and 50 rpm) for 2 h in 10 mL of simulated gastric fluid containing pepsin (SGF/USP) and then transferred to 10 mL of SIF with pancreatin. The samples were withdrawn every hour for 6 h for the lipase activity assay (n=3).

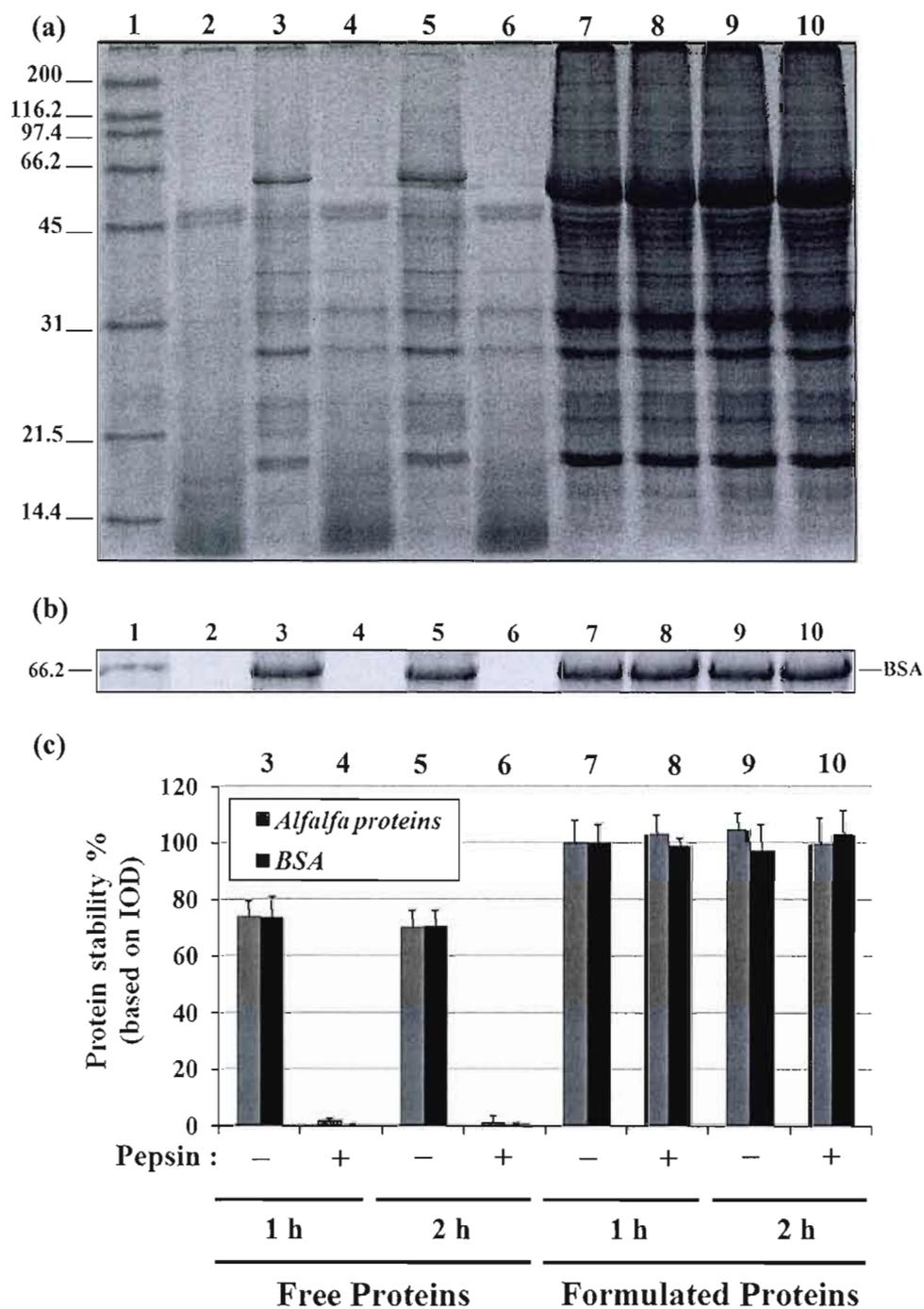


Fig. 1

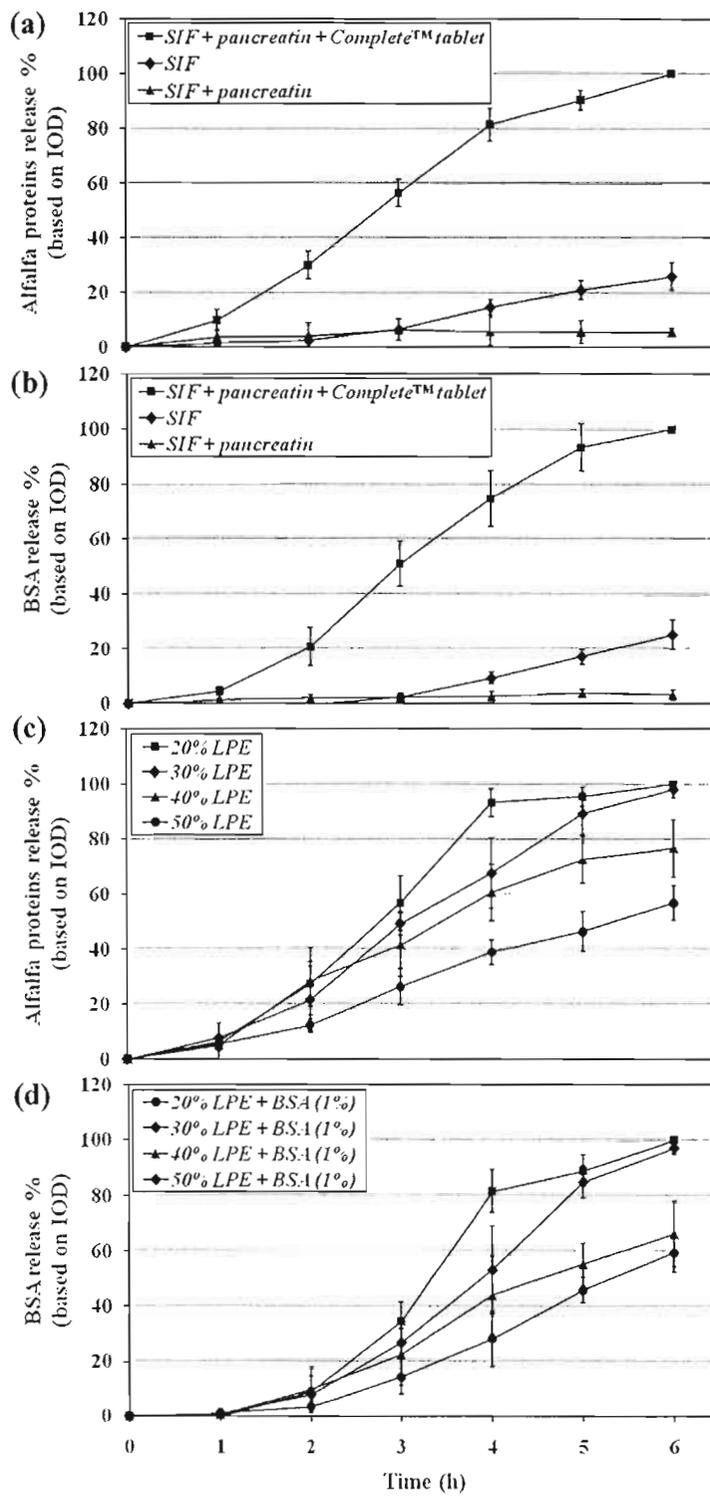


Fig.2

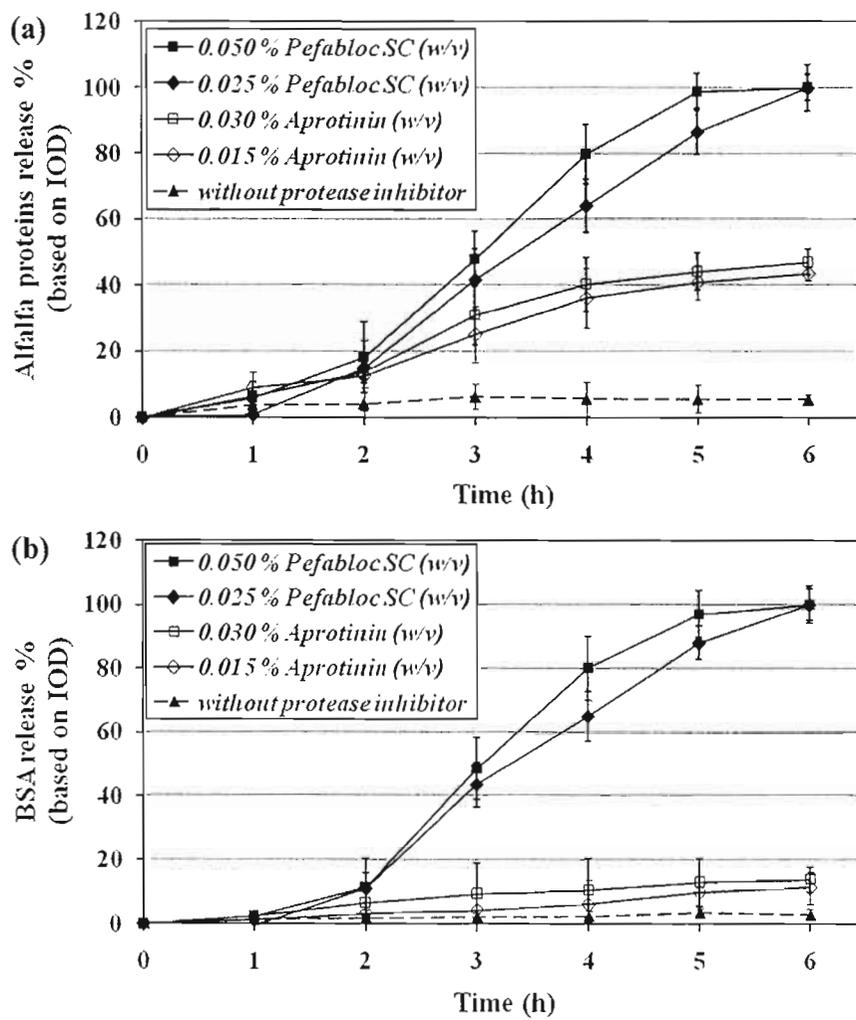


Fig. 3

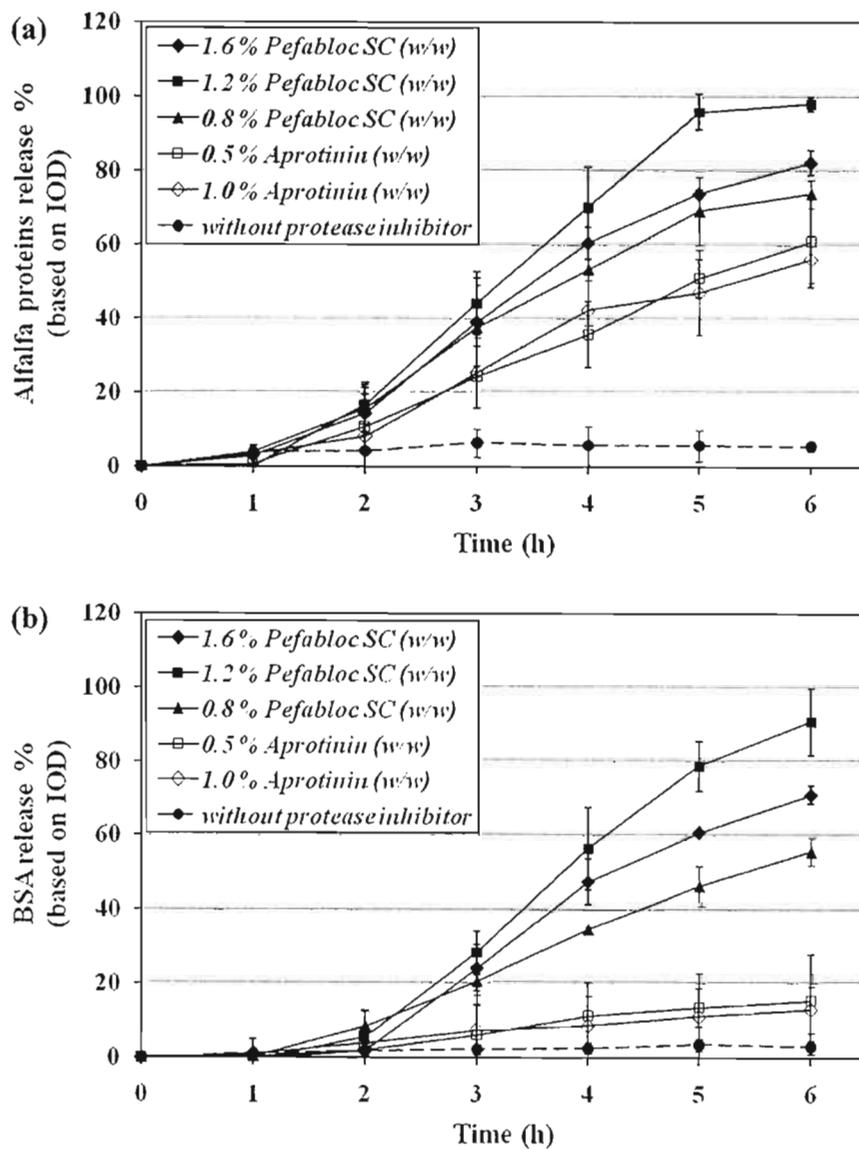


Fig. 4

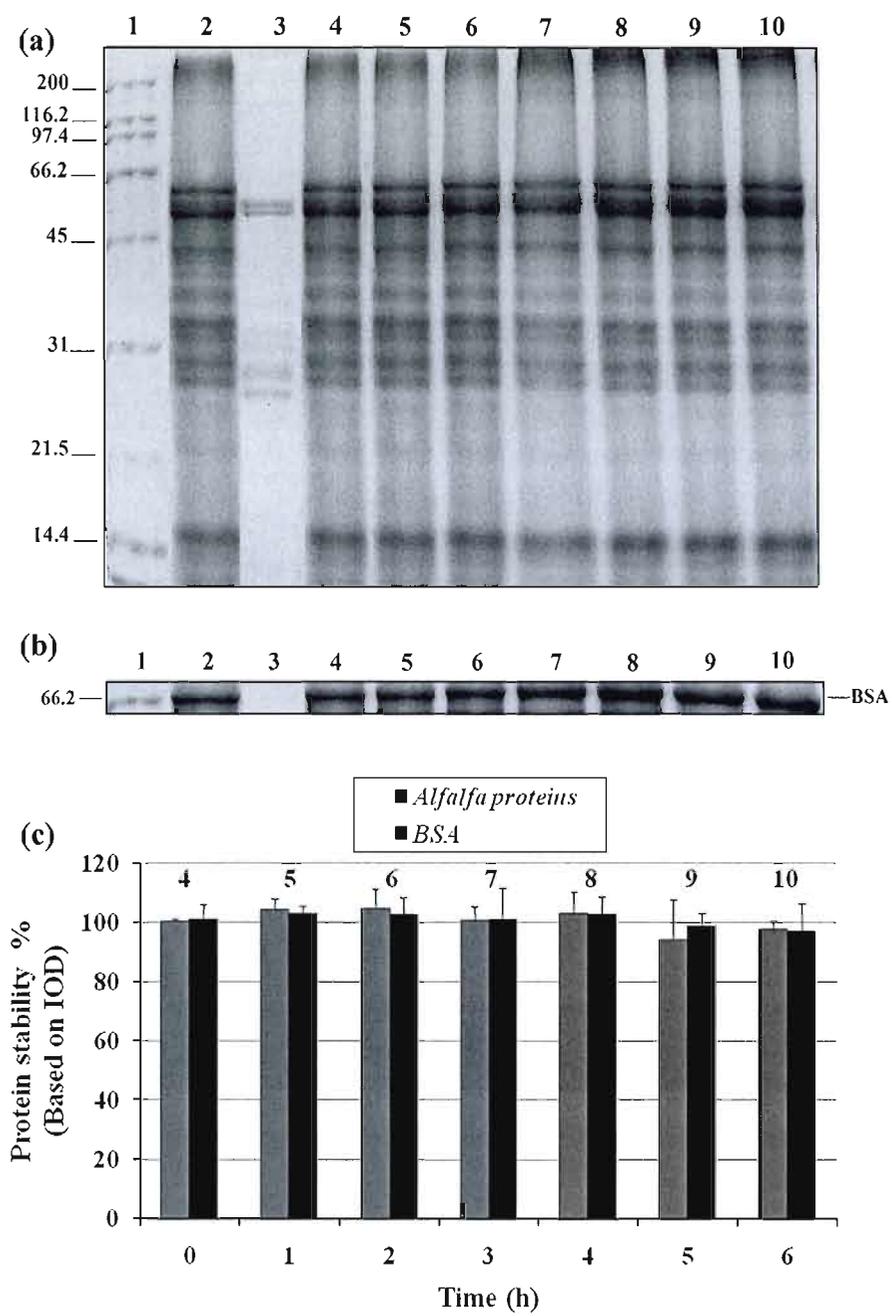


Fig. 5

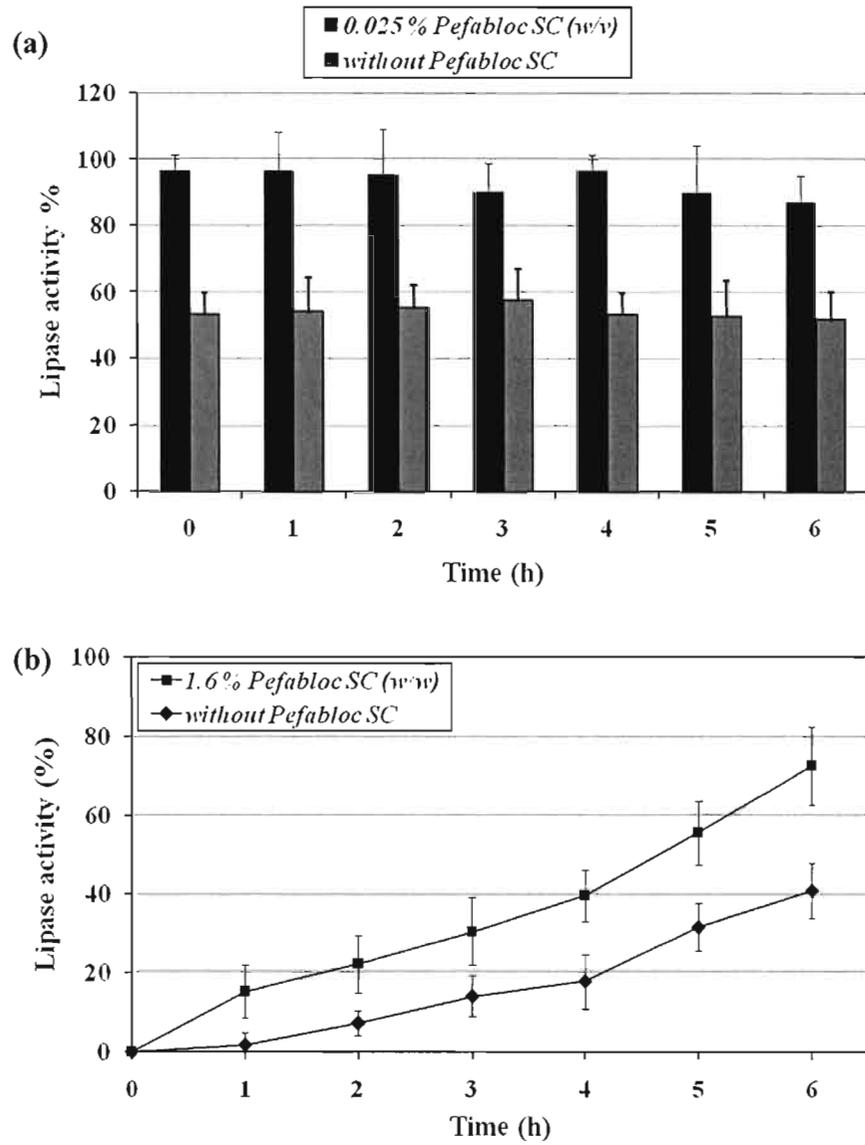


Fig. 6

## CHAPITRE VI

### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le carboxyméthyl amidon a été proposé comme excipient pour la libération de matériel bio-actif d'origine végétale. Plusieurs aspects ont été étudiés afin de développer une formulation compatible avec une optique vaccinale : i) La capacité d'offrir une protection à l'extrait de protéines de luzerne (APE : *alfalfa protein extract*) dans l'estomac étudiée en présence du fluide simulant les conditions de pH et d'activité enzymatique gastrique; ii) Une stabilisation des protéines végétales libérées en milieu simulant les conditions intestinales face à la dégradation protéolytique générée par la pancréatine dans le milieu de dissolution; iii) L'utilisation de différentes catégories d'inhibiteurs de protéases à sérine testée d'une part dans le milieu de libération et d'autres part dans la formulation. Par rapport au choix de l'inhibiteur, il a été vérifié : iv) La stabilité des protéines végétales en présence de protéases à sérine et de l'inhibiteur de protéases Pefabloc SC; v) La stabilité de la structure protéique évaluée par la mesure de la conservation de l'activité enzymatique de la lipase comme enzyme traceur.

#### Protection des protéines végétales et du traceur dans le milieu gastrique

Les conditions de pH gastriques ont été simulées en présence ou non de pepsine pendant 1 ou 2 h sur l'extrait végétal non formulé et formulé avec du carboxyméthyl amidon (CMA) à raison de 25 % (w/w) en APE. Une différence significative a été observée au niveau de la dégradation, en présence de pepsine, des protéines de l'extrait non formulé par rapport à celle observée dans les mêmes conditions pour l'extrait formulé avec la matrice de CMA. Le CMA s'avère donc nécessaire pour assurer la stabilité des protéines végétales lors du passage gastrique et les protéger contre la dégradation protéolytique due à la pepsine.

Un niveau de protection gastrique similaire a été mis en évidence par Calinescu et al. (2007) dans le cadre de la formulation de *fimbrillae F4 d'Escherichia coli* entérotoxigène avec une matrice de CMA. Lors de la formulation d'enzymes pancréatiques avec le CMA, Massicotte et al. (2008) ont constaté un maintien de l'activité de la lipase et de la trypsine de l'ordre de 72% après 2 h d'incubation dans du SIF contenant de la pancréatine.

#### Libération des protéines végétales et du traceur dans le milieu intestinal

La libération des protéines végétales a été effectuée dans une solution simulant les conditions intestinales en présence ou non de pancréatine. Sans pancréatine, une libération progressive et modérée des protéines végétales est observée, atteignant 30% après 6 h. Ce type de libération est généré par les phénomènes de gonflement et d'érosion de la matrice polymérique. En présence de pancréatine, une dissolution plus rapide du comprimé a été observée. Cette accélération de la libération est due à une érosion enzymatique provoquée par l'alpha-amylase contenue dans l'extrait pancréatique ajouté au milieu de dissolution. Cette différence au niveau de la cinétique d'érosion a précédemment été mise en évidence par Calinescu et al. (2007) et expliquée par le fait que le CMA peut être, dans une certaine limite, un substrat potentiel de l'alpha amylase.

Dans le milieu intestinal, les protéines libérées sont rapidement clivées par les protéases à sérine pancréatiques, justifiant l'introduction d'inhibiteur de protéases dans le milieu de dissolution afin de quantifier leur libération. En présence d'inhibiteur de protéases, délivré par une tablette *Complete*<sup>™</sup> ajoutée au milieu de dissolution, une libération de la totalité des protéines végétales a été observée dans une période de 6 h. Dans le cadre d'une immunisation mucosale, cet intervalle de temps correspond au

temps de résidence du bol alimentaire au niveau du petit intestin, où sont localisées les plaques de Peyer, et donc est compatible avec une optique vaccinale.

### Test de chargement

L'utilisation de tablettes *Complete*<sup>™</sup> dans le milieu de libération permet d'inhiber l'activité protéolytique des protéases intestinales et d'évaluer la libération de protéines végétales ainsi que du traceur protéique. Diverses formulations à base de CMA à différentes charges en extrait végétal ont été testées en augmentant la quantité de matériel bioactif formulé, afin de maximiser la quantité de matériel bioactif libérée au niveau du petit intestin.

On a observé, pour des charges de 20 et 30 %, une libération continue des protéines végétales jusqu'à 100 % et une dissolution progressive et complète du comprimé en 6 h. Pour des charges plus importantes en extrait végétal, le comprimé avait une structure apparente plus compacte et était associé une dissolution partielle en 6 h (une libération de 75 et de 55 % est atteinte pour des charges de 40 et 50 %). Lorsque la libération du traceur protéique (BSA) fut suivie, le même type de profil linéaire a été observé pour les charges de 20 et 30 %, et on observa une libération partielle pour des formulations de 40 et 50 % atteignant 65 et 60 % de dissolution après 6 h.

Une charge de 30 % fut donc jugée optimale pour la formulation d'APE assurant une libération progressive et totale en 6 h. Pour les formulations chargées au delà de 40 % en APE, une structure compacte fut générée après compression empêchant une désagrégation complète du comprimé dans le milieu de libération. Ce comportement cohésif du comprimé en solution pourrait être expliqué par la teneur en fibres de l'extrait végétal de luzerne. Pour les formulations chargées en dessous de 30 % en APE, la

structure cohésive de l'extrait végétale était déstabilisée par une proportion majoritaire de CMA qui agit dans ce cas comme désintégrant.

#### Formulation d'inhibiteurs de protéases à sérine

Deux catégories d'inhibiteurs de protéases à sérine, disponibles sous forme de poudre, et donc possiblement formulables par compression directe ont été testées. L'aprotinine est un inhibiteur réversible de protéases agissant par formation de complexe avec l'enzyme au niveau de son site catalytique (Kassel et al., 1965a et b). Elle a précédemment été testée par Larionova et al. (1999) dans le cadre de l'administration de peptides et protéines thérapeutiques. Le Pefabloc SC est un inhibiteur irréversible de protéases qui agit par acylation d'un résidu séryl au niveau du site catalytique des protéases à sérine. Il a été utilisé *in vivo* lors de l'administration par voie orale de l'hexareline (Westberg et al., 2001).

Ces deux catégories d'inhibiteurs ont d'abord été testées dans le milieu de libération afin de caractériser leur efficacité contre la protéolyse. Deux concentrations ont été testées pour chacun d'eux. L'aprotinine présente en solution à 0,015 et 0,030 % (w/v) a offert une protection de 50 % des protéines végétales libérées et de 15 % du marqueur protéique. Le Pefabloc SC présent en solution à 0,025 et 0,050 % (w/v) a permis une protection de 100 % des protéines végétales ainsi que du marqueur protéique.

Lorsqu'ils furent introduits dans la formulation, les inhibiteurs de protéases ont été libérés en même temps que les agents bioactifs et ont permis donc la protection de ceux-ci contre la protéolyse au niveau de leur site d'absorption. Lorsque des proportions de 0,5 et 1,0 % (w/w) en aprotinine ont été utilisées dans la formulation, on a observé une protection de 55 et 60 % des protéines végétales et de 10 et 15 % du marqueur protéique. Lorsque des proportions de 0,8 %, 1,2 % et 1,6 % (w/w) en Pefabloc SC ont

étées formulées, 70 %, 80 % et 95 % des protéines végétales et 55 %, 70 % et 90 % du traceur protéique ont été retrouvés dans le milieu de libération après dissolution du comprimé. L'efficacité du Pefabloc SC à protéger les protéines libérées fut jugée plus importante que celle offerte par l'aprotinine face à la dégradation protéolytique.

Par rapport à d'autres inhibiteurs de protéases à sérine de nature chimique, le Pefabloc SC ou 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) montre une toxicité nettement inférieure que celle de ses homologues Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 4-Amidinophenyl-methanesulfonyl fluoride (APMSF) ou le Diisopropylfluorophosphate (DFP) (Mintz et al., 1993). Le Pefabloc SC [LD50 = 2,8 g/kg (oral)] est aussi caractérisé par une plus grande efficacité au niveau de son pouvoir d'inhibition (Diatchuck et al., 1997) (Tableau 6.1).

**Tableau 6.1 :** Activité inhibitrice du Pefabloc SC par rapport à celle du PMSF et du DFP pour plusieurs protéases à sérine (K<sub>app</sub> est la pseudo constante de vitesse d'inactivation des protéases pour les différents inhibiteurs) (Lawson et al., 1982).

Serine protease	K <sub>app</sub> /I (l × mol <sup>-1</sup> × s <sup>-1</sup> )		
	Pefabloc SC	PMSF	DFP
Trypsin	3.06	2.57	6.23
Chymotrypsin	178	25.0	39.0
Plasmin	0.32	0,05	0.19
Plasmin Kallikrein	0.68	0,07	0.3
Thrombin	5.12	1.95	1.28
Glandular Kallikrein	0.19	0.05	0.05
TPA	1.19	nd	nd
Subtilisin A	0.46	nd	nd

### Stabilité des protéines végétales en présence de l'inhibiteur Pefabloc SC

En termes de stabilité des protéines libérées, la conservation de la structure primaire des protéines végétales et du traceur protéique a été évaluée au cours du temps dans un milieu simulant les conditions intestinales en présence de pancréatine et de l'inhibiteur de protéases Pefabloc SC. L'utilisation de la BSA comme traceur protéique se justifie par le fait que la protéine a une structure globulaire et ne risque pas de perturber la libération des protéines végétale. De plus, la BSA est sensible au clivage protéolytique des protéases à sérine (Reed et al., 1975) et permettra donc de donner une bonne indication sur la protection de l'intégrité des protéines libérées

À la concentration de 0,025 % (w/v) en Pefabloc SC, le maintien de l'intégrité des protéines végétales et du traceur a été observée pendant 6 h. Ceci conforte l'idée de la possibilité d'utiliser les inhibiteurs pour l'immunisation mucoale intestinale, garantissant une protection des protéines vaccinales libérées jusqu'à ce qu'elles atteignent leur site d'action. Des résultats similaires ont été trouvés lors de la protection de l'hexareline par un mélange de chymostatine, Pefabloc SC, EDTA, and EGTA face à la dégradation protéolytique jusqu'à son site d'absorbtion (Westberg et al., 2001).

### Libération et conservation de l'activité d'un traceur enzymatique

Afin d'évaluer la préservation de la structure tridimensionnelle des protéines libérées, un traceur enzymatique a été ajouté à l'extrait de protéines de luzerne. L'activité de la lipase a été mesurée, dans le milieu de libération, pour une formulation de 30 % en APE contenant 1 % (w/w) d'enzyme traceur. Une plus grande activité lipasique (presque 2 fois plus importante) a été observée après 6 h de libération dans le cas d'une formulation contenant 1.6 % de Pefabloc SC par rapport à une formulation n'en contenant pas.

Afin de tester le maintien de la structure tridimensionnelle au cours du temps, l'extrait végétal contenant la lipase a été incubé dans du SIF contenant de la pancréatine et l'inhibiteur Pefabloc SC, pendant 6 h. La mesure de l'activité a montré une activité lipasique deux fois plus importante dans le cas d'un milieu d'incubation contenant du Pefabloc SC par rapport à un milieu n'en contenant pas. La conservation de l'activité enzymatique est représentative de la préservation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Lors de l'immunisation par un antigène, les anticorps générés sont dirigés contre une région épitopique caractérisée par une structure tridimensionnelle spécifique d'où l'importance d'une protection de l'antigène jusqu'au site d'induction lors d'une vaccination par voie orale.

#### Conclusions et Perspectives

Les résultats obtenus pour des formulations à base de CMA contenant des inhibiteurs de protéases permettent de conclure à une protection efficace du matériel bioactif et une libération des protéines végétales en milieu intestinal. Pour des travaux futurs, il sera intéressant de tester, *in vivo*, la formulation de protéines de plantes transgéniques exprimant un immunogène afin de mesurer une réponse en anticorps de type IgA associée à l'immunité mucoale.

## BIBLIOGRAPHIE

\*\*\* World Health Report. 1998. "Fifty facts." from the World Health Report 1998: global health situation and trends 1955-2025. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Arakawa T., Chony D.K.X., Lengridge W.H.R., 1998. "Efficacy of a food plant based oral cholera toxin B subunit vaccine." *Nature Biotechnol.*, 16:292-297.

Bailey K., Hopkins R.H., Dolby D.E., 1937. "The mechanism of degradation of starch by amylase: The action of malt amylase on alpha-amylodextrin." *Biochem J.*, 31:586-590.

Baldassarre H., Schirm M., Deslauriers J., Turcotte C., Bordignon V., 2009. "Protein profile and alpha-lactalbumin concentration in the milk of standard and transgenic goats expressing recombinant human butyrylcholinesterase." *Transgenic Res.*, 18:621-632.

Baldwin P.M., 2001. "Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review." *Starch/Stärke*, 53:475-503.

Balmer Y., Vensel W.H., Cai N., Manieri W., Schurmann P., Hurkman W.J., Buchanan B.B., 2006. "A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103:2988-2993.

Banks W., Greenwood C.T., 1971. "The Conformation of Amylose in Dilute Solution." *Starch/Stärke*, 23:300-314.

Banks W., Greenwood C.T., 1975. "Starch and its Components." (Banks W., Greenwood C.T., eds.), Univ Press., Edinburg.

Baxter D., 2007. "Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing." *Occup Med.*, 57:552-556.

Belenky D.M., Rozenfeld E.L., 1972. "Determination of maltase and glucoamylase activity of gamma-amylase in polyacrylamide gel before and after the action of urea." *Vopr Med Khim.*, 18:220-222.

BeMiller J.N., 1973. "Starch amylose." Dans: *Industrial Gums - Polysaccharides and their derivatives* (Whistler R.L., BeMiller J.N., Eds.), Academic Press, pp. 545-566, New York, NY.

Berger G., Saint-Lébe L., 1971. "Formation of hydrogen peroxide during gamma irradiation of corn starch." *Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.*, 272:1455-1458.

Besarab A., DeGuzman A., Swanson J.W., 1981. "Effect of albumin and free calcium concentrations on calcium binding in vitro." *J Clin Pathol.*, 34:1361-1367.

Bird R, Hopkins RH., 1954. "The action of some alpha-amylases on amylose." *Biochem J.*, 56:86-99.

Blanshard J.M.V., 1979. "Physicochemical aspects of starch gelatinization." Dans: *Polysaccharides in food*. (Blanshard J.M.V., Mitchell J.R., eds.), Butterworths, pp. 139-152, London, UK.

Blanshard J.M.V., 1987. "Starch granule structure and function: a physicochemical approach." Dans: *Starch: Properties and Potential*. (Galliard T., eds), Critical Reports in Applied Chemistry, Society of Chemical Industry, pp. 16-54, London, UK.

Bolin T., Franzen L., Sjudahl R., Tagesson C., 1986. "Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. Influence of lysolecithin on rat ileal permeability to different-sized molecules." *Scand J Gastroenterol.*, 21:441-448.

Brouillet F., Bataille B., Cartilier L., 2008. "High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: formulation aspects and *in vitro* drug-release evaluation." *Int J Pharm.*, 356:52-60.

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

Busse U., Levée V., Trépanier S., Vézina L., 2002. "Production of antibodies in alfalfa (*Medicago sativa*)." Dans: *Molecular farming of plants and animals for human and veterinary medicine* (L. Erickson, W.-J. Yu, J. Brandle R. Rymerson Eds.), Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0835-Y, the Netherlands.

Caldini G., Strappini C., Trotta F., Cenci G., 1999. "Implications of alpha-amylase production and beta-glucuronidase expression in *Escherichia coli* strains." *Microbios.*, 99:123-130.

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

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

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

Capell T., Claparols I., Del Duca S., Bassie L., Miro B., Rodriguez-Montesinos J., Christou P., Serafini-Fracassini D., 2004. "Producing transglutaminases by molecular farming in plants." *Amino Acids*, 26:419-423.

Cartillier L., Mateescu M.A., Dumoulin Y., Lenaerts V., 1994. "Crosslinked polyhydroxylic material for enzymatically controlled drug release." International Patent, (PCT/CA94/00 1 1 63).

Cartilier L., Mateescu M.A., Dumoulin Y., Lenaerts V., 1997. "Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets." U S Patent 5 616 343.

Chang P.S., Park K.O., Shin H.K., Suh D.S., Kim K.O., 2008. "Physicochemical properties of partially oxidized corn starch from bromide-free TEMPO-mediated reaction." *J Food Sci.*, 73:C173-178.

Chippendale G.M., 1972. "Polysaccharide requirements of the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* (Oliv.)." *J Nutr.*, 102:187-194.

Choi S.M., Lee O.S., Kwon S.Y., Kwak S.S., Yu D.Y., Lee H.S., 2003 "High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures." *Biotechnol Lett.*, 25:213-218.

Corr S.C., Gahan C.C., Hill C., 2008. "M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis." *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 52:2-12.

Cros C., 1995. "New pharmaceutical compositions containing Polycarbophil." European Patent 0 455 561.

Crotty S., Felgner P., Davies H., Glidewell J., Villarreal L., Ahmed R., 2003. "Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination." *J Immunol.*, 171:4969-4973.

Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K., 2001a. "Medical molecular farming : production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants." *Trends in Plant Sciences*, 6:219-226.

Daniell H., Muthukumar B., Lee S.B., 2001b. "Market free transgenic plants : engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection." *Curr Genet.*, 39:109-116.

Daniell H., 2006. "Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome." *Biotechnol J.*, 1:1071-1079.

Datta S.K., Cho H.J., Takabayashi K., Horner A.A., Raz E., 2004. "Antigen-immunostimulatory oligonucleotide conjugates: mechanisms and applications." *Immunol Rev.*, 199:217-226.

De Buck S.S., Sinha V.K., Fenu L.A., Gilissen R.A., Mackie C.E., Nijsen M.J., 2007. "The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools." *Drug Metab Dispos.*, 35:649-659.

DesRieux A., Ragnarsson E.G., Gulberg E., Preat V., Schneider Y.J., Artursson P., 2005. "Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium." *Eur J Pharm Sci.*, 25:455-465.

Diatchuk V., Lotan O., Koshkin V., Wikstroem P., Pick E., 1997. "Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds." *J Biol Chem.*, 272:13292-13301.

Doelker E., 1985. "Cinétique et mécanismes de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques." Dans: *Formes pharmaceutiques nouvelles.* (Bun P., Puisieux F., Dolker E., Benoit J.P., eds.), TEC and DOC, p. 75, Paris, France.

Dumazert C., 1950. "Acid hydrolysis and elementary analysis of starch and glycogen." *Bull Soc Chim Biol.*, 32:988-997.

Dumoulin Y., Clement P., Mateescu M.A., Cartilier L., 1994. "Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in compressed tablets." *S.T.P. Pharma Sci.*, 4:329-335.

Dumoulin Y., Alex S., Szabo P., Cartilier L., Mateescu M.A., 1998a. "Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis." *Carbohydr Polym.*, 37:361-370.

Dumoulin Y., Carrière F., Ingenito A., 1998b. "Manufacture of cross-linked amylose useful as an excipient for controlled release of active compounds." U.S. Patent 5 807 575.

Dumoulin Y., Cartilier LH, Mateescu MA., 1999. "Cross-linked amylose tablets containing alpha-amylase: an enzymatically-controlled drug release system." *J Control Release*, 60:161-167.

Duprat F., Gallant D., Guilbot A., Mercier C., Robin J.P., 1980. "L'amidon." Dans: *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés.* (Monties B., ed.), Gauthier Villaras, pp. 176-231, Paris, France.

Erickson L., Yu W.J., Brandle J., Rymerson R., 2002. "Molecular Farming of Plants and Animals for Human and Veterinary Medicine." (L Erickson, W-J Yu, J Brandle, R Rymerson Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp 339-368, the Netherlands.

Fannon J.E., Bemiller J.N., 1992. "Structure of Corn Starch Paste and Granule Remnants Revealed by Low-Temperature Scanning Electron Microscopy after Cryopreparation." *Cereal Chem.*, 69:456-460.

Fernández-San Millán A., Mingo-Castel A., Miller M., Daniell H., 2003. "A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation." *Plant Biotechnol J.*, 1:71-79.

Foster J.F., 1965. "Physical properties of amylose and amylopectin in solution." Dans: Starch : Chemistry and Technology. (Whistler R.L., Paschall E.F., eds.), Academic Press Inc., p. 349, New York, NY.

Foster J.F., 1985. "Physical properties of amylose and amylopectin in solution." Dans: Starch : Chemistry and Technology, 2<sup>nd</sup> édition. (Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F., eds.), Academic Press Inc., New York, NY.

Foss D.L., Murtaugh M.P., 2000. "Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces." *Anim Health Res Rev.*, 1:3-24.

French D., 1984. "Organization of Starch Granules." Dans: Starch: Chemistry and Technology, 2nd edition. (Westler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F., eds.), Academic Press Inc., pp. 184-247, Orlando, FL.

Gallant D.J., Guilbot A., 1969. "Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparations en microscopie électronique." *Starch-Stärke*, 21:156-163.

Gidley M.J., Cooke D., 1991. "Aspects of molecular organization and ultrastructure in starch granules." *Biochem Soc Trans.*, 19:551-555.

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., 2000. "Kuby Immunology" 4<sup>th</sup> Ed., W.H. Freeman and Company, pp. 3-59, New York.

Gómez E., Chimeno Zoth S., Carrillo E., Estela Roux M., Berinstein A., 2008 "Mucosal immunity induced by orally administered transgenic plants." *Immunobiology*, 213:671-675.

Gomord V., Sourrouille C., Fitchette A.C., Bardor M., Pagny S., Lerouge P., Faye L., 2004a. "Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals : the antibodies as a challenge." *Plant Biotechnol. J.*, 2:83-100.

Gomord V., Faye L., 2004b. "Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants" *Current Opinion in Plant Biology*, 7:171-181.

Gönül N., Oğan-Hasçıçek C., Baykara T., 2000. "The consolidation and compressibility properties of some novel directly compressible filler-binders." *Acta Pol Pharm.*, 57:311-317.

Greenblatt D.J., 2006. "Pharmacokinetic determinants of hypnotic drug action: The art and science of controlling release." *Sleep Med.*, 1:10-14.

Guo J., Wang M.H., 2008. "Transgenic tobacco plants overexpressing the Nicta; CycD3; 4 gene demonstrate accelerated growth rates." *BMB Rep.*, 41:542-547.

Hamzaoui N., Kerneis S., Caliot E., Pringault E., 2004. "Expression and distribution of b1-integrins in in vitro-induced M-cells: implications for Yersinia adhesion to Peyer's patch epithelium." *Cellular Microbiol.*, 6:817-828.

Harwood W.A., Bartlett J.G., Alves S.C., Perry M., Smedley M.A., Leyland N., Snape J.W., 2009a. "Barley transformation using Agrobacterium-mediated techniques." *Methods Mol Biol.*, 478:137-147.

Harwood W.A., Smedley M.A., 2009b. "Barley transformation using biolistic techniques." *Methods Mol Biol.*, 478:125-136.

Hee Lee Y., Leesman G.D., Makhey V., Yu H., Hu P., Perry B., Sutyak J.P., Wagner E.J., Falzone L.M., Stern W., Sinko P.J., 2000. "Regional oral absorption, hepatic first pass effect, and non-linear disposition of salmon calcitonin in beagle dogs." *Eur J Pharm Biopharm.*, 50:205-211.

Helander A., Miller C.L., Myers K.S., Neutra M.R., Nibert M.L., 2004. "Protective immunoglobulin A and G antibodies bind to overlapping intersubunit epitopes in the head domain of type 1 reovirus adhesin sigma1." *J Virol.*, 78:10695-10705.

Hoffman A., Stepensky D., Ezra A., Van Gelder J.M., Golomb G., 2001. "Mode of administration-dependent pharmacokinetics of bisphosphonates and bioavailability determination." *Int J Pharm.*, 220:1-11.

Ho F.F.L., Kohler R.R., Ward G.A., 1972. "Determination of Molar Substitution and Degree of Substitution of Hydroxypropyl Cellulose by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry." *Anal Chem.*, 44:178-181.

Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K., Mharandi A., 2003. "Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges." *Vaccine*, 21:89-95.

Hopkins R.H., Jelinek B., Harrison L.E., 1948. "The action of beta-amylase on potato amylose." *Biochem J.*, 43:32-38.

Huang Z., Dry I., Webster D., Struynell R., Wesselingh S., 2001. "Plant derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice." *Vaccine*, 19:2163-2171.

Ispas-Szabo P., Ravenelle F., Hassan I., Preda M., Mateescu M.A., 2000. "Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch for use in controlled drug release." *Carbohydr. Res.*, 323:163-175.

Jane J.L., Shen J.J., Radosavljevic M., Kasemsuwan T., Xu A., Seib P.A., 1993. "Internal structure of starch granules." Dans: *Carbohydrates and carbohydrate polymers. Analysis, biotechnology, modification. Antiviral, biomedical and other application.* (Yalpani M., ed.), ATL Press Inc., pp. 174-184, Shrewsbury, UK.

Jani D., Meena L.S., Rizwan-ul-Haq Q.M., Singh Y., Sharma A.K., Tyagi A.K., 2002. "Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants." *Transgenic Res.*, 11:447-454.

Jarowenko W., 1986. "Acetylated starch and miscellaneous organic esters." Dans: *Modified starches: Properties and uses.* (Wurzburg O.B., ed.), CRC Press, pp. 55-77, Boca Raton, FL.

Jenkins P.J., Donald A.M., 1995. "The influence of amylose on starch granule structure." *Int J Biol Macromol.*, 17:315-321.

Jensen V.B., Harty J.T., Jones B.D., 1998. "Interaction of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M-cells and murine Peyer's patches." *Infect Immun.*, 66:3758-3766.

John M., Schmidt J., Kneifel H., 1983. "Iodine Maltosaccharine Complexes: Relation between Chain Length and Colour." *Carbohydr Res.*, 119:254-257.

Kadaoui K.A., Corthésy B., 2007. "Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment." *J Immunol.*, 179:7751-7757.

Kassell B., Radicevic M., Ansfield M.J., Laskowski M., 1965a. "The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. IV. The linear sequence of the 58 amino acids." *Biochem Biophys Res Commun.*, 18:255-258.

Kassell B., Laskowski M., 1965b. "The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. V. The disulfide linkages." *Biochem Biophys Res Commun.*, 20:463-468.

Khoudi H., Laberge S., Ferullo J.M., Bazin R., Darveau A., Castonguay Y., Allard G., Lemieux R., Vezina L.P., 1999. "Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants." *Biotechnol Bioeng.*, 64:135-143.

Kim T.G., Baek M.Y., Lee E.K., Kwon T.H., Yang M.S., 2008. "Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture." *Plant Cell Rep.*, 27:885-891.

- Ko K., Steplewski Z., Glogowska M., Koprowski H., 2005. "Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102:7026-7030.
- Kopertekh L., Schiemann J., 2005. "Agroinfiltration as a tool for transient expression of cre recombinase in vivo." *Transgenic Res.*, 14:793-798.
- Kościańska E., Kalantidis K., Wypijewski K., Sadowski J., Tabler M., 2005. "Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*." *Plant Mol Biol.*, 59:647-661.
- Kovacs E., Keresztes A., 2002. "Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells." *Micron*, 33:199-210.
- Kragten E.A., Leeftang B.R., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 1992. "1H-N.m.r. spectroscopy of O-carboxymethyl derivatives of D-glucose." *Carbohydr. Res.*, 228:433-437.
- Krog N., 1971. "Amylose Complexing Effect of Food Grade Emulsifiers." *Starch/Stärke*, 23:206-210.
- Kuakpetoon, D., Wang, Y.J., 2006. "Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content." *Carbohydr Res.*, 341:1896-1915.
- Langer R.S., 1990. "New methods of drug delivery." *Science*, 249:1527-1533.
- Langer R.S., Peppas N.A., 1983. "Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review." *J Macromol Sci Revs Macromol Chem Phys.*, 23:61-126.

Langlois D.P., Wagoner J.A., 1967. "Production and use of amylose." Dans: Starch: Chemistry and technology, Volume II, (Whistler R.L., Paschal E.F., eds.), Academic Press Inc., pp. 451-497, New-York, NY.

Lawson W.B., Valenty V.B., Woe J.D., Lobo A.P., 1982. "Studies on the inhibition of human thrombin: Effects of plasma and plasma constituents." *Folia Haematol*, 109:52-60.

Leach H.W., 1965. "Gelatinisation of starch." Dans: Starch : Chemistry and Technology, (Whistler R.L., Paschall E.F. eds.), Academic Press Inc., pp. 289-307, New-York, NY.

Leach W.H., 1984. "Gelatinisation of Starch." Dans: Starch: Chemistry and Technology, 2nd edition, (Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F. eds.), Academic Press Inc., New-York, NY.

Le Meur M., 1984. "L'amidon de maïs: comportement rhéologique, rôle des lipides en technologie." Thèse, Université de Nantes.

Lenaerts V., Dumoulin Y., Cartilier L., Mateescu M.A., 1992. "Cross-linked amylose tablets for controlled-release of drugs." *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater.*, 19:30-31.

Lenaerts V., Dumoulin Y., Mateescu M.A., 1991. "Cross-linked amylose tablets for linear slow-release of theophylline." *J Control Release*, 15:39-46.

Liang E., Kabcenell A.K., Coleman J.R., Robson J., Ruffles R., Yazdanian M., 2001. "Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells." *J Pharmacol Toxicol Methods*, 46:93-101.

Lieu T.A., Davis R.L., Capra A.M., Mell L.K., Quesenberry C.P., Martin K.E., Zavitkovsky A., Black S.B., Shinefield H.R., Thompson R.S., Rodewald L.E., 2001.

“Variation in clinician recommendations for multiple injections during adoption of inactivated polio vaccine.” *Pediatrics*, 107:E49.

Ma J.K., Lehner T., Stabila P., Fux C.I., Hiatt A., 1994. “Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants.” *Eur J Immunol.*, 24:131-138.

MacGregor E.A., Greenwood C.T., 1980. “Polysaccharides.” Dans : *Polymers in Nature*. (MacGregor E.A., Greenwood C.T., Eds.), John Wiley & Sons Ltd., pp. 240-328, New York, NY.

MacLennan I.C., 1994. “Germinal centers.” *Annu Rev Immunol.*, 12:117-139.

Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J., 1992. “Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants.” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89:11745-11749.

Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J., 1998. “Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene.” *Vaccine*, 16:1336-1343.

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

Mateescu M.A., Cartilier L., Dumoulin Y., Lenaerts V., 1992. “Contramid® : A short overview.” Rougier inc., Montréal.

Mateescu M.A., Ispas-Szabo P., Mulhbach J., 2006. “Cross-linked starch derivatives for highly loaded pharmaceutical formulations” Dans : *Polyysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications - ACS Symposium Series 934*. (Marchessault R., Ravenelle F., Zhu X.X., Eds.), Oxford University Press., pp. 121-137, Philadelphia, PA.

Mateescu M.A., Lenaerts V., Dumoulin Y., 1994. "Crosslinked material for controlled release of biologically active compounds." Brevet Canada 2 041 774 (1995, brevet États-Unis 5 456 921).

Mateescu M.A., Schell H.D., 1983. "A new amyloclastic method for the selective determination of alpha-amylase." *Carbohydr Res.*, 124:319-323.

Mateescu M.A., Schell H.D., Enache E., Valsanescu T., Bentia T., Petrescu A., Zarchievi V., Rotaru C., 1985. "Selective determination of alpha-amylase with cross-linked substrate tablets." *Anal Lett.*, 18:79-91.

McCormick A.A., Kumagai M.H., Hanley K., Turpen T.H., Hakim I., Grill L.K., Tusé D., Levy S., Levy R., 1999. "Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 19:703-708.

McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R., Tusé D., 2003. "Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig." *J Immunol Methods*, 278:95-104.

McGhee J.R., Xu-Amano J., Miller C.J., Jackson R.J., Fujihashi K., Staats H.F., Kiyono H., 1994. "The common mucosal immune system: from basic principles to enteric vaccines with relevance for the female reproductive tract." *Reprod Fertil Dev.*, 6:369-379.

Miles M.J., Morris V.J., Ring S.D., 1985. "Gelation of amylose." *Carbohydrate Res.*, 135: 257-269.

Mintz G.R., 1993. "An irreversible serine protease inhibitor." *BioPharm.*, 6:34-38.

Morishita M., Peppas N.A., 2006. "Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?" *Drug Discovery Today*, 11:905-910.

Moussa I.S., Cartilier L.H., 1996. "Characterisation of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis." *J Control Release*, 42:47-55.

Moussa I.S., Lenaerts V., Cartilier L.H., 1998. "Image analysis studies of water transport and dimensional changes occurring in the early stages of hydration in cross-linked amylose matrices." *J Control Release*, 52:63-70.

Muhrbeck P., Tellier C., 1991. "Determination of the Phosphorylation of Starch from Native Potato Varieties by  $^{31}\text{P}$  NMR." *Starch/Stärke*, 43:23-27.

Mulhbacher J., Ispas-Szabos P., Lenaerts V., Mateescu M.A., 2001. "Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loading." *J Control Release*, 76:51-58.

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

Mulhbacher J., Ispas-Szabo P., Ouellet M., Alex S., Mateescu M.A., 2006. "Mucoadhesive properties of cross-linked high amylose starch derivatives." *Int J Biol Macromol.*, 40:9-14.

Mulhbacher J., Mateescu M.A., 2005. "Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release III. Diffusion properties." *Int J Pharm.*, 297:22-29.

Néel J., 1972. "Conformation des macromolécules." Dans: *Chimie Moléculaire*, volume II. (Champetier G., Buvet R., Néel J., Sigwalt P., eds.), Hermann, pp. 395-597, Paris, France.

Nikkels A.F., Nikkels-Tassoudji N., Piérard G.E., 2005. "Cutaneous adverse reactions following anti-infective vaccinations." *Am J Clin Dermatol.*, 6:79-87.

Nilsson O., Wu E., Wolfe D.S., Weigel D., 1998. "Genetic ablation of flowers in transgenic Arabidopsis." *Plant J.*, 15:799-804.

Odinsen O., Owusu-Ofori S., Dompok A., Sarkodie F., Opare-Sem O., Parker D., Allain J.P., 2007. "Antibody detection and kinetics of antibody production during early stages of immunization with hepatitis B virus vaccine." *Clin Vaccine Immunol.*, 14:1623-1628.

Ogra P.L., Faden H., Welliver R.C., 2001. "Vaccination strategies for mucosal immune responses." *Clin Microbiol Rev.*, 14:430-445.

Ouzilou L., Caliot E., Pelletier I., Prevost M.C., Pringault E. Colbere-Garapin F., 2002. "Poliovirus transcytosis through M-like cells." *J Gen Virol.*, 83:2177-2182.

Owen R.L., 1977. "Sequential uptake of HRP by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study." *Gastroenterology*, 72:440-451.

Phan T.G., Amesbury M., Gardam S., Crosbie J., Hasbold J., Hodgkin P.D., Basten A., Brink R., 2003. "B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells." *J Exp Med.*, 197:845-860.

Piccioni E., Barcaccia G., Falcinelli M., Standardi A., 1997. "Estimating alfalfa somaclonal variation in axillary branching propagation and indirect somatic embryogenesis by RAPD fingerprinting." *Int J Plant Sci.*, 158:556-562.

Radley J.A., 1976. "Industrial Uses of Starch and its Derivatives." Applied Science Publishers, London.

Rayas-Duarte P., Rupnow J.H., 2006. "Gamma-Irradiation Affects Some Physical Properties of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*) starch." J Food Sci., 58:389-394.

Reed R.G., Feldhoff R.C., Clute O.C., Peters T.Jr., 1975. "Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding." Biochemistry, 14:4578-4583.

Reisinger K.S., Block S.L., 2008. "Characteristics of an ideal rotavirus vaccine." Clin Pediatr., 47:555-563.

Rindlav-Westling A., Stading M., Hermansson A.M., Gatenholm P., 1998. "Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films." Carbohydr Polym., 36:217-224.

Rindlav-Westling A., Stading M., Gatenholm P., 2002. "Crystallinity and morphology in films of starch, amylose and amylopectin blends." Biomacromolecules, 3:84-91.

Ring S.G., Colonna P., I'Anson K.J., Kalichevsky M.T., Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., 1987. "The gelation and crystallisation of amylopectin." Carbohydr Res., 162:277-293.

Robin J.P., Mercier C., Charbonniere R., Guilbot A., 1974. "Lintnerized Starches. Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starch." Cereal Chem., 51:389-406.

Rowland M., Tozer T.N., 1980. "Clinical pharmacokinetics: Concepts and application." (Rowland M. et Tozer T.N., eds), Lea et Febiger, p. 117, Philadelphia, PA.

Saffran M., Kumar G., Savariar C., Burnham J., Williams F., Neckers D., 1986. "A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs." Science, 233:1081-1084.

Sajilata M.G., Singhal R.S., Kulkarni P.R., 2006. "Resistant Starch - A Review." *Comp Rev Food. Sci Food Saf.*, 5:1-17.

Sandhu J.S., Krasnyanski S.F., Dormer L.L., Korban S.S., Osadjan M.D., Buetow D.E., 2000. "Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response." *Transgenic Res.*, 9:127-135.

Sansonetti P.J., Phalipon A., 1999. "M-cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process." *Semin Immunol.*, 11:193-203.

Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS., 2008. "An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles." *Vaccine*, 26:1846-1854.

Schmucker D.L., Owen R.L., Outenreath R., Thoreux K., 2003. "Basis for the age-related decline in intestinal mucosal immunity." *Clin Dev Immunol.*, 10:167-172.

Schoh T.J., 1945. "Carbohydrate Chemistry." (Pigman W.W., Wolfrom M.L. eds.), Academic Press., pp. 247-277, New York, NY.

Seguchi M., Yamada Y., 1989. "Study of Proteins Extracted from the Surface of Wheat Starch Granules with Sodium Dodecyl Sulfate." *Cereal Chem.*, 66:193-196.

Sha Z., Kang S.M., Compans R.W., 2005. "Mucosal immunization of CD4+ T cell-deficient mice with an inactivated virus induces IgG and IgA responses in serum and mucosal secretions." *Virology*, 331:387-395.

Shah U., Augsburger L., 2002. "Multiple sources of sodium starch glycolate, NF: Evaluation of functional equivalence and development of standard performance tests." *Pharm Dev Technol.*, 7:345-359.

Shiftan D., Ravenelle F., Mateescu M.A., Marchessault R.H., 2000. "Change in the V/B Polymorph Ratio and T1 Relaxation of Epichlorohydrin Crosslinked High Amylose Starch Excipient." *Starch/Stärke*, 52:186-195.

Shimizu H., Takeda N., 2008. "Universal use of inactivated poliovirus vaccine--the needs and challenges." *Nippon Rinsho.*, 66:1950-1955.

Skinner J.S., Meilan R., Ma C., Strauss S.H., 2003. "The populus PTD promoter imparts floral-predominant expression and enables high levels of floral-organ ablation in *Populus*, *Nicotiana* and *Arabidopsis*." *Molecular breeding*, 12:119-132.

Solarek D.B., 1986. "Cationic starches" Dans: *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), CRC Press Inc., pp. 113-129, Boca Raton, FL.

Sotnikova E.V., Gapparov M.M., Zhushman A.I., 2003. "The analysis of digestion of starches from wheat with the different amylose content *in vitro* conditions." *Vopr Pitan.*, 72:24-25.

St-Amand P.C., Skinner D.Z., Peadar R.N., 2000. "Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects." *Theor Appl Genet.*, 101:107-114.

Stauffer F., El-Bacha T., Da Poian A.T., 2006. "Advances in the development of inactivated virus vaccines." *Recent Patents Anti-Infect Drug Discov.* 1:291-296.

Stephens R., Langhorne J., 2006. "Priming of CD4+ T cells and development of CD4+ T cell memory; lessons for malaria." *Parasite Immunol.*, 28:25-30.

Streatfield S.J., Lane J.R., Brooks C.A., Barker D.K., Poage M.L., Mayor J.M., Lamphear B.J., Drees C.F., Jilka J.M., Hood E.E., Howard J.A., 2003. "Corn as a production system for human and animal vaccines." *Vaccine*, 21:812-815.

Swarbrick J., Boylan J., 1990. "Controlled- and Modulated-release Drug-Delivery Systems." Dans: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Swarbrick J., ed.), Marcel Dekker Inc., pp. 281-313, New York, NY.

Tacket C.O., Mason H.S., 1999. "A review of oral vaccine with transgenic vegetables." *Microbes Infect.*, 1:777-783.

Tacket C.O., 2000. "Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes." *J. Infect. Dis.*, 182:302-305.

Taub D.D., Ershler W.B., Janowski M., Artz A., Key M.L., McKelvey J., Muller D., Moss B., Ferrucci L., Duffey P.L., Longo D.L., 2008. "Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study." *Am J Med.*, 121:1058-1064.

Tharanathan R.N., 2005. "Starch-value addition by modification." *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 45:371-384.

Thrash T., 1995. "Controlled-Release Drug Delivery Systems: Mechanisms of Intestinal-Specific Polymeric Degradation." *The Journal of the Denison Chemical Society*, 1:5-9.

Trubiano P.C., 1995. "The role of speciality food starches in flavour encapsulation." pp. 244-253, ACS Symposium Series 610.

Twyman R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fisher R., 2003. "Molecular farming in plants : host systems and expression technology." *Trends in Biotechnology*, 21:570-578.

Tzfira T., Citovsky V., 2006. "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology." *Curr Opin Biotechnol.*, 17:147-154.

Vălsănescu T., Mateescu M.A., Schell H.D., Enache E., Benția T., Scânteie L., Zarchievi V., Rotaru C., 1985. "All-reagent test tablets and method for rapid and selective alpha-amylase iodometric determination." *Anal Biochem.*, 146:299-306.

Varma M.V., Khandavilli S., Ashokraj Y., Jain A., Dhanikula A., Sood A., Thomas N.S., Pillai O., Sharma P., Gandhi R., Agrawal S., Nair V., Panchagnula R., 2004. "Biopharmaceutic classification system: a scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research." *Curr Drug Metab.*, 5:375-388.

Veregin R.P., Fyfe C.A., Marchessault R.H., 1987. "Investigation of the crystalline V amylose complex by high-resolution C13 CP/MAS NMR Spectroscopy." *Macromolecules*, 20:3007-3012.

Weeks J.T., Ye J., Rommens C.M., 2008. "Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*)." *Transgenic Res.*, 17:587-597.

Wehrle P.F., 1968. "Immune response with particular reference to the use of multiple antigens." *Calif Med.*, 109:452-457.

Weston W.M., Klein N.P., 2008. "Kinrix: a new combination DTaP-IPV vaccine for children aged 4-6 years." *Expert Rev Vaccines.*, 7:1309-1320.

Whistler R.L., Daniel J.R., 1984. "Molecular Structure of Starch." In *Starch Chemistry and Technology*. 2nd ed. (Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F. eds), Academic press., pp. 153-182, Orlando, FL.

Wigdorovitz A., Carrillo C., Dus Santos M.J., Trono K., Peralta A., Gomez M.C., Rios R.D., Franzone P.M., Sadir A.M., Escribano J.M., Borca M.V., 1999. "Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1." *Virology*, 255:347-353.

- Williams J. M., 1968. The chemical evidence for the structure of starch. In J. Radley, ed., Starch and its derivatives. 4th ed. Chapman and Hall Ltd., London.
- Wood A.H., Zhang X., Farber D.L., 2007. "Strome SE. CD8+ memory T lymphocytes from bone marrow--immune function and therapeutic potential." *Crit Rev Immunol.*, 27:527-537.
- Wu H.H-C., Sarko A., 1978. "The double-helical molecular structure of crystalline Amylose." *Carbohydr Res.*, 61:27-41.
- Wurzburg O.B., 1986. "Modified Starches: Properties and uses." (Wurzburg O.B. ed.), CRC Press Inc., pp. 132-136 et 187-188, Boca Raton, FL.
- Youm J.W., Won Y.S., Jeon J.H., Ryu C.J., Choi Y.K., Kim H.C., Kim B.D., Joung H., Kim H.S., 2007. "Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice." *Vaccine*, 25:577-584.
- Yu D., McLean M.D., Hall J.C., Ghosh R., 2008. "Purification of a human immunoglobulin G1 monoclonal antibody from transgenic tobacco using membrane chromatographic processes." *J Chromatogr A.*, 1187:128-137.
- Zafiroopoulos A., Andersson E., Krambovitis E., Borrebaeck C.A., 1997. "Induction of antigen-specific isotype switching by in vitro immunization of human naive B lymphocytes." *J Immunol Methods*, 200:181-190.
- Zallie J.P., 1989. "The Role and Function of Specialty Starches in the Confection Industry." Technical Articles, National Starch and Chemical Corporation, Bridgewater, NJ, USA.
- Zhao N, Augsburger LL., 2005. "Functionality comparison of 3 classes of superdisintegrants in promoting aspirin tablet disintegration and dissolution." *AAPS PharmSciTech.*, 6:634-640.

Zhong Q, Gu Z, Glatz CE., 2006. "Extraction of recombinant dog gastric lipase from transgenic corn seed." *J Agric Food Chem.*, 54:8086-8092.

Zwick M.B., Burton D.R., 2007. "HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design." *Curr HIV Res.*, 5:608-624.

## **ANNEXES**

## Novel Carboxymethyl Starch Excipients for Oral Dosage Forms

Pompilia Ispas Szabo, Patrick De Koninck, Carmen Calinescu  
and Mircea Alexandru Mateescu\*

Department of Chemistry & Biochemistry and BioMed Center, Université du Québec à Montréal,  
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

\* Corresponding author: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

### Summary

Starch treatment with monochloroacetate generated Carboxymethyl derivatives which can be obtained as sodium or protonated forms by controlling the final pH of washing media. The protonated carboxymethyl derivative exhibited better gastro-resistance compared to its sodium salt and both excipients afforded total gastric protection of drugs when formulated as dry-coated dosages.

### Introduction

Compared to current practice based on enteric coatings applied via fluidized bed procedure, the novel Carboxymethyl Starch (CMS) derivatives offer a simpler and solvent-free alternative to get an increased gastro-protection of oral solid formulations.

The CMS was previously described as excipient and used for formulation of small molecules as well as microorganisms (*Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus*) in monolithic<sup>1</sup> or dry-coated gastro-resistant tablets<sup>2</sup>. The carboxylic groups give an enhanced gastric stability and higher hydration, swelling or erosion in intestinal medium, modulating thus the delivery of drug. This study presents pharmaceutical characteristics of CMS excipients obtained in protonated CM(H)S and sodium CM(Na)S salt forms.

### Experimental methods

Different substitution degrees were obtained by treatment of High Amylose Starch (Hylon VII, National Starch, USA) with various amounts of monochloroacetic acid<sup>1,2</sup>.

For the same substitution degree, CM(H)S and CM(Na)S powders could be obtained by alternative precipitations and pH media adjustments, followed by washing and drying.

The novel excipients were characterized by FT-IR, potentiometric titration, swelling properties (data not shown) and dissolution profiles with and without digestive enzymes.

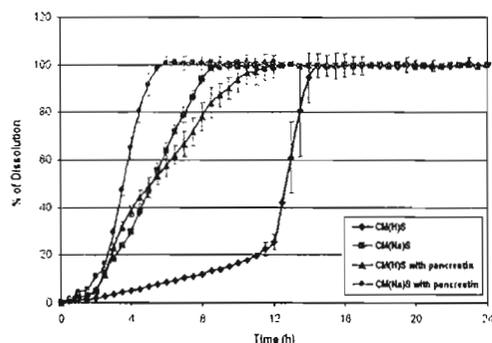
The capacity of CM(H)S and CM(Na)S to afford gastric protection of various active molecules (i.e. non-steroidal anti-inflammatory and antipyretic drugs) was tested with i) monolithic and ii) dry-coated tablets. For both series, tablets of 500 mg were obtained with 20% tracers (Sodium Diclofenac, Acetyl salicylic acid and Acetaminophen).

The monolithic tablets were obtained by one step direct compression (2.3 T/cm<sup>2</sup>) of homogeneous mixtures of active agent and excipients powders, while for dry-coated tablets two compressions steps were required (first 150 mg core compression followed by a second compression with CMS at 3 T/cm<sup>2</sup>). The gastric resistance of tablets was tested using a USP apparatus II at 100 rpm, for 2 h in 900 mL pepsin-free simulated gastric fluid (SGF) at 37 °C followed by a period in simulated intestinal fluid (SIF). Drug release in both media was determined in UV at specific wavelengths. All formulations were tested in parallel in SGF and in SIF containing pancreatin (USP 28 method).

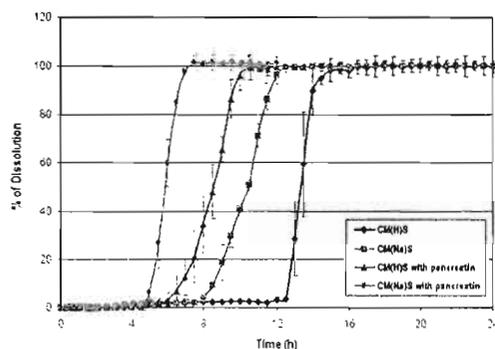
### Results and Discussion

Dry-coated tablets based on CM(H)S afford a complete gastric protection for all tested active molecules. In the case of monolithic tablets based on the two mentioned polymeric forms, a limited release in acidic media was found, whereas in the case of dry-coated tablets, the release in SGF was

practically delayed. The mechanism of drug release is related to the carboxyl group protonation: in the gastric acidity the carboxyl side groups are protonated. In SIF, the change of protons with sodium cations induces a high swelling, erosion and drug dissolution<sup>3</sup>.

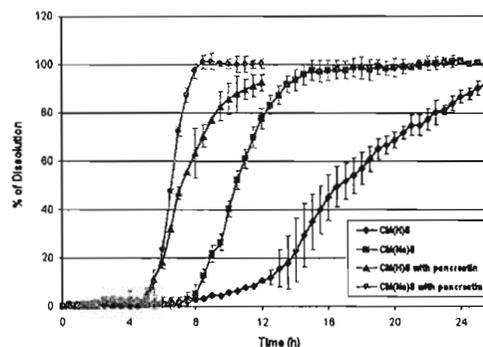


**Figure 1:** Dissolution profiles for Diclofenac monolithic tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).



**Figure 2:** Dissolution profiles for Diclofenac dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).

Both excipients (sodium and protonated) afforded gastro-protection and ensured a delayed drug delivery up to 4-5 h, even in the presence of digestive enzymes in the dissolution media.



**Figure 3:** Acetyl Salicylic acid release from dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S maintained 2h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm (with and without pancreatin).

## Conclusion

The presence of ionic groups on the Carboxymethyl Starch chains has a major impact on polymer swelling/erosion, controlling the mechanism of drugs release. The formulation with the proposed CMS excipients represents an alternative for wet coating procedure. Not only a manufacturing step is eliminated, but tablets obtained by direct compression of dry CMS powders and selected drugs, will not be exposed to risky solvents.

## Acknowledgements

Thanks are due to Dr A. Richard and Valeo Inc for support and interest in this project.

## Selective references

1. C. Calinescu, J. Mulhbacher, E. Nadeau, JM Fairbrother, M. A. Mateescu. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005, 60, 53-60.
2. P. Ispas-Szabo, C. Calinescu, M.A. Mateescu. *Transactions,* 2006, # 853
3. J. Mulhbacher, P. Ispas-Szabo, M.A. Mateescu. *Int. J. Pharm.,* 2004, 278, 231-238.

## Novel Carboxymethyl Starch Excipients for Oral Dosage Forms

Pompilia Ispas Szabo, Patrick De Koninck, Carmen Calinescu and Mircea Alexandru Mateescu\*  
 Department of Chemistry & Biochemistry and BioMed Center, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.  
 \* Corresponding author: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

### ABSTRACT

Starch treatment with monochloroacetate generates Carboxymethyl derivatives which can be obtained as sodium (carboxylate) or protonated (carboxylic) forms by controlling the final pH of washing media. The protonated carboxymethyl derivative exhibited better gastro-resistance compared to its sodium salt and both excipients afforded total gastric protection of drugs when formulated as dry-coated dosages.

### INTRODUCTION

Compared to current practice based on enteric coatings applied via fluidized bed procedure, the novel Carboxymethyl Starch (CMS) derivatives offer a simpler and solvent-free alternative to get an increased gastro-protection of oral solid formulations. The CMS was previously described as excipient and used for formulation of large molecules as well as microorganisms (*Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus*) in monolithic [1] or dry-coated gastro-resistant tablets [2]. The carboxylic groups give an enhanced gastric stability and higher hydration, swelling or erosion in intestinal medium, modulating thus the delivery of drug. This study presents pharmaceutical characteristics of CMS excipients obtained in protonated CM(H)S and sodium CM(Na)S salt forms.

### EXPERIMENTAL

#### Synthesis of polymeric derivatives (CMS):

Two forms of the carboxymethyl starch (CMS) were synthesized as previously described [3]. The two derivatives, protonated and sodic forms, were obtained by pH media adjustment during the final step of the synthesis. Maintained low pH (2.5) during 30 min is necessary to obtain the protonated form of the CMS.

#### Excipients characterization:

- CMS substitution degree: Potentiometric titration.
- Dissolution test: The gastric resistance of tablets was tested using a USP apparatus II at 100 rpm, for 2 h in 900 mL pepsin-free simulated gastric fluid (SGF) at 37 °C followed by a period in simulated intestinal fluid (SIF). Drug release in both media was determined in UV at : 280 nm for acetaminophen, 248 nm for acetylsalicylic acid and 274 nm for sodium diclofenac. All formulations were tested in parallel in SGF and in SIF containing pancreatin (USP 28 method).
- FTIR: KBr tablets containing 3.75% polymer
- Swelling behaviour: For each polymer, tablets of 500 mg were swollen in 50 ml of water or urea until they reached the equilibrium.

### RESULTS

Dry-coated tablets based on CM(H)S afford a complete gastric protection for all tested active molecules. In the case of monolithic tablets based on the two mentioned polymeric forms, a limited release in acidic media was found, whereas in the case of dry-coated tablets, the release in SGF was practically delayed. The release mechanism is related to the carboxylic group *in situ* protonation; in the gastric acidity the carboxylic side groups are protonated. In SIF, the change of protons with sodium cations induces a high swelling, erosion and drug dissolution [4].

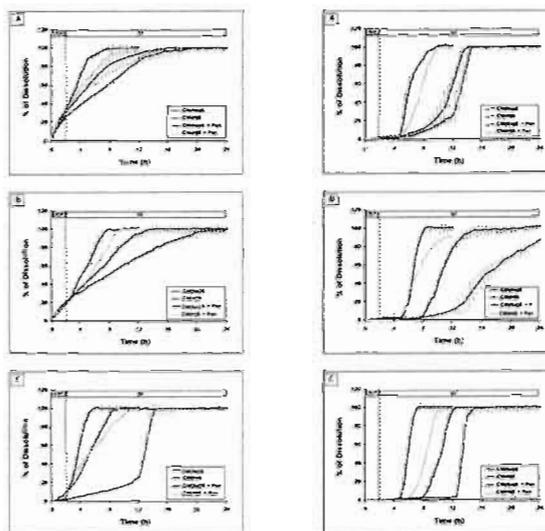


Figure 1: Dissolution profiles for monolithic tablets based on CM(H)S and CM(Na)S loaded with 20% of (A) Acetaminophen; (B) Acetylsalicylic acid; (C) Sodium Diclofenac. All tablets were maintained 2 h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm in presence or absence of pancreatin (pan).

Figure 2: Dissolution profiles for dry-coated tablets based on CM(H)S and CM(Na)S loaded with 20% of (A) Acetaminophen; (B) Acetylsalicylic acid; (C) Sodium Diclofenac. All tablets were maintained 2 h in SGF followed by SIF using a USP apparatus II, at 100 rpm in presence or absence of pancreatin (pan).

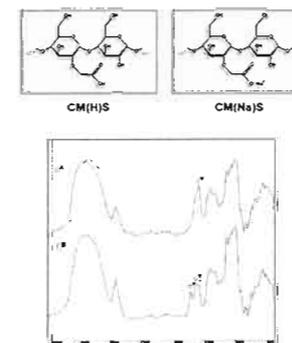


Figure 3 : FTIR spectra of (A) CM(Na)S and (B) CM(H)S

### CONCLUSIONS

The presence of ionic groups on the Carboxymethyl Starch chains has a major impact on polymer swelling/erosion, controlling the mechanism of drugs release. The formulation with the proposed CMS excipients represents an alternative for wet coating procedure. Not only a manufacturing step is eliminated, but tablets obtained by direct compression of dry CMS powders and selected drugs, will not be exposed to risky solvents.

### SELECTED REFERENCES

1. C. Calinescu, J. Mulhbach, E. Nadeau, JM Fairbrother, M. A. Mateescu, *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60, 53-60.
2. P. Ispas-Szabo, C. Calinescu, M.A. Mateescu, *Transactions, CRS Meeting*, 2006, # 853
3. H. D. Schell, M. Serban, M. A. Mateescu, T. Bentia, *Rev. Roumaine Chim.*, 1978, 23, 1143-1147.
4. J. Mulhbach, P. Ispas-Szabo, M.A. Mateescu, *Int. J. Pharm.*, 2004, 278, 231-238.

### ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Valeo Inc and Dr A. Richard for support and interest in this project.

## **Formulation d'agents thérapeutiques de petites masses moléculaires avec matrices à base de carboxyméthyl amidon**

Patrick De Koninck, Pompilia Ispas-Szabo, Carmen Calinescu, Mircea Alexandru Mateescu  
(Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal)

Les propriétés pH-dépendantes du Carboxyméthyl amidon (CMA) comme excipient pharmaceutique peuvent conférer une protection des agents actifs contre l'acidité gastrique et un contrôle sur leur libération au niveau intestinal. Le CMA a déjà été utilisé pour la formulation de microorganismes et de protéines de masses moléculaires élevées. Cette étude présente la formulation de cet excipient avec des agents bioactifs de petite masse moléculaire. Deux variantes du CMA, une forme sodique et une forme protonnée, ont été synthétisées par précipitation de la suspension d'amidon carboxyméthylé à un pH neutre ou acide. Des études de dissolution avec ces deux variantes du CMA ont été effectuées pour des formulations de divers principes actifs comme l'acétaminophène (analgésique, antipyrétique neutre), l'acide acétylsalicylique (analgésique, antipyrétique acide) et le diclofenac (anti-inflammatoire non stéroïdien). Les tests ont été effectués sur des comprimés de types monolithiques et doubles noyaux de 500 mg contenant 20% de principes actifs. Les profils de dissolution ont été suivis pendant 2 h dans un milieu simulant les conditions gastriques et ensuite pendant 24 h dans un milieu simulant les conditions intestinales. Pour cette seconde phase, les études ont été effectuées avec et sans pancréatine dans le milieu de dissolution. Des tests de gonflement dans l'eau et dans l'urée ont été effectués sur des comprimés de 500 mg de CMA afin d'expliquer les différences de comportement rencontrées lors de la dissolution de formulations à base de ces deux catégories de matrices.

## Formulation d'agents thérapeutiques de petites masses moléculaires avec matrice à base de carboxyméthyl amidon

Patrick De Koninck, Pompilia Ispas-Szabo, Carmen Calinescu, et Mircea-Alexandru Mateescu  
 Département de Chimie et de Biochimie, Centre Biomed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

### RÉSUMÉ

Le traitement de l'amidon avec de l'acide monochloroacétique permet la synthèse d'un dérivé carboxyméthylé qui peut être obtenu sous forme sodique ou protonnée par contrôle du pH. Les deux excipients peuvent être utilisés pour des dosages solides administrés par voie orale. La forme protonnée du carboxyméthyl amidon offre, pour des comprimés monolithiques, une meilleure protection contre l'acidité gastrique que sa forme sodique. Les deux excipients offrent une protection gastrique totale quand ils sont formulés sous forme de comprimés doubles noyaux. Dépendamment du principe actif et de ses paramètres pharmacocinétiques, la libération peut être ciblée à différentes régions du tractus gastro-intestinal par utilisation de l'une ou l'autre des formes du CMA.

### INTRODUCTION

Il a été montré que la forme sodique du carboxyméthyl amidon (CMA-Na+) utilisée comme excipient pharmaceutique confère une protection gastrique des agents actifs [1]. Dans la présente étude, une forme protonnée du CMA a été synthétisée et évaluée comme excipient pharmaceutique pour des formulations administrables par voie orale. Des tests ont été effectués sur des comprimés monolithiques et doubles noyaux de 500 mg contenant 20% de différents principes actifs : l'acétaminophène (analgésique, antipyrétique neutre), l'acide acétylsalicylique (analgésique, antipyrétique acide) et le diclofénac sodique (anti-inflammatoire non stéroïdien). La libération de ces actifs intégrés dans des comprimés à base de la forme sodique et de la forme protonnée du CMA a été suivie pendant 2 h dans un milieu simulant les conditions gastriques (SGF) et ensuite pendant 22 h dans un milieu simulant les conditions intestinales (SIF). En sachant que les dérivés d'amidon modifiés pourraient être des substrats pour les enzymes présentes dans le milieu intestinal, l'étape SIF a été effectuée avec et sans pancréatine dans le milieu de dissolution. Les différences structurales des deux formes de l'excipient ont été mises en évidence par analyse spectrale (FTIR).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### Synthèse des excipients polymériques:

Les deux formes de carboxyméthyl amidon sont synthétisées selon le protocole décrit précédemment [2]. Les deux variantes de l'excipient, protonnées et sodique, sont obtenues par le contrôle du pH dans l'étape finale de la synthèse. Une période de 30 minutes dans un milieu à pH 2.5 est nécessaire pour l'obtention de la forme protonnée.

#### Détermination du degré de substitution du CMA:

Dosage potentiométrique.

#### Caractérisation des deux excipients:

FTIR, étude de gonflement dans l'eau et l'urée.

#### Évaluation de la libération de l'actif:

Mesure de l'absorbance à 280 nm pour l'acétaminophène, à 246 nm pour l'acide acétylsalicylique et à 274 nm pour le diclofénac.

### RÉSULTATS

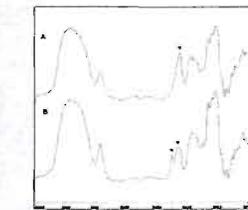
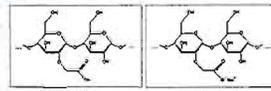
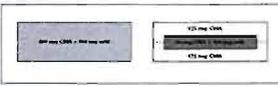


Fig. 1 : Spectre FTIR du CMA (A) forme sodique (B) forme protonnée



Comprimés monolithiques et doubles noyaux

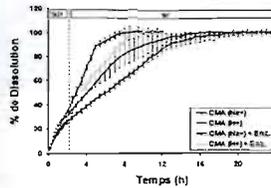


Fig. 2 : Profils de dissolution de comprimés monolithiques d'acétaminophène

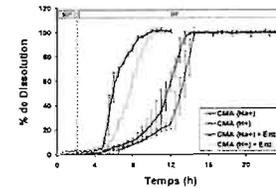


Fig. 3 : Profils de dissolution de comprimés doubles noyaux d'acétaminophène

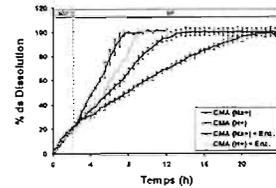


Fig. 4 : Profils de dissolution de comprimés monolithiques d'acide acétylsalicylique

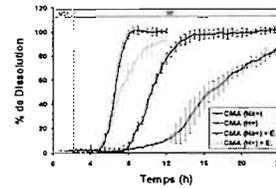


Fig. 5 : Profils de dissolution de comprimés doubles noyaux d'acide acétylsalicylique

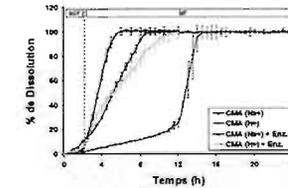


Fig. 6 : Profils de dissolution de comprimés monolithiques de diclofénac sodique

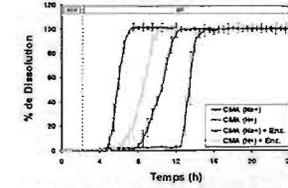


Fig. 7 : Profils de dissolution de comprimés doubles noyaux de diclofénac sodique

### CONCLUSIONS

- Les comprimés monolithiques génèrent des profils de dissolution linéaires pour une période allant de 12 à 20 h dépendamment du principe actif.
- Les comprimés doubles noyaux offrent une protection totale en milieu gastrique et une libération pulsatile en milieu intestinal.
- La libération des principes actifs à partir des comprimés à base de CMA protonné est contrôlée par des mécanismes de gonflement et de diffusion.
- Pour la forme sodique du CMA, c'est le phénomène d'érosion qui module la libération des actifs.

### RÉFÉRENCES

[1] C. Calinescu, J. Mulbacher, E. Nadeau, J. M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Eur. J. Pharm. Biopharm. 60 (2005) 53-60.  
 [2] H. D. Schnell, M. Serban, M. A. Mateescu, T. Bentia, Rev Roumaine Chim. 23 (1978) 1143-1147.

## **Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par voie orale.**

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup> et Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3</sup>.

(1) Université du Québec à Montréal, Département de Chimie; (2) Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques; (3) Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Plusieurs organismes pathogènes ont comme porte d'entrée dans l'organisme les muqueuses comme par exemple celles tapissant les tractus respiratoire et gastro-intestinal. Dans ce contexte, il est important, dans une procédure de vaccination, de cibler l'induction de l'immunité mucoale au site même de l'infection afin d'obtenir une protection optimale. L'objectif global de ce projet de recherche est d'induire une immunité mucoale par expression d'une protéine immunogène d'un organisme pathogène d'intérêt dans des plantes transgéniques comme vecteurs d'expression. Ces protéines végétales incluant des immunogènes peuvent ensuite être utilisées à des fins d'immunisation orale avec comme résultante une stimulation de l'appareil lymphoïde de la muqueuse intestinale et, sur la base du concept du système immunitaire commun aux muqueuses, de celui d'autres muqueuses comme celle du système respiratoire. Une limite inhérente à cette approche de vaccination orale est la barrière stomacale en égard du pH gastrique et de l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. Afin de palier à ce problème, il s'avère important de protéger les protéines immunogènes en incorporant les extraits végétaux dans une matrice polymérique utilisée à des fins de transport jusqu'à la muqueuse intestinale où la réponse immunitaire, via les interactions des cellules immunitaires s'y retrouvant (tissu lymphoïde associé aux muqueuses sous-jacentes ou GALT), pourra alors avoir lieu. Pour ce faire, les protéines végétales, contenant la protéine immunogène d'intérêt, doivent être formulées avec un excipient polymérique chargé de libérer les protéines au site d'action. L'excipient sélectionné est le carboxyméthyl amidon (CMA) qui offre, en plus de la protection gastrique et de la libération ciblée de l'actif au niveau intestinal (Calinescu et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2005), une stabilisation des protéines au sein du comprimé. L'étape de compression de la formulation sous forme de comprimés monolithiques de 200 mg, contenant 20 % d'extrait végétal préalablement lyophilisé, fut réalisée pendant 1 minute à la pression de 2,5 T/cm<sup>2</sup> dans un moule de 9 mm de diamètre. L'étude du profil électrophorétique des protéines végétales a démontré l'importance de la dégradation protéique issue du passage gastrique, d'où la nécessité de protéger les protéines avec le CMA. Après formulation de ces mêmes protéines avec l'excipient et simulation in vitro du passage gastrique, le profil électrophorétique des protéines végétales obtenu est comparable à celui des protéines avant formulation et traitement. D'autres expériences sont en cours afin de valider le concept de gastro-protection des protéines végétales et la libération de protéines immunogènes dans des conditions simulant l'environnement physiologique de l'intestin grêle. Cette technologie sera ensuite appliquée à un modèle d'infection virale porcine associée au virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc (VSRRP), une des infections porcines les plus importantes économiquement, le but étant d'induire une immunité mucoale spécifique à ce virus suite à l'immunisation par des protéines immunogènes virales exprimées chez la plante.

# Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par voie orale

De Koninck Patrick <sup>1,3</sup>, Denis Archambault <sup>2,3</sup>, Fathey Sarhan <sup>2</sup> et Mircea Alexandru Mateescu <sup>1,3</sup>

(1) Université du Québec à Montréal, Département de Chimie; (2) Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques; (3) Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP)

UQAM

Université du Québec à Montréal

CRIP  
CENTRE DE RECHERCHE  
EN INFECTIOLOGIE PORCINE

Université  
de Montréal

## RÉSUMÉ

Ce projet vise à développer un procédé de vaccination par voie orale contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur chez le porc (VSRSP) à base de protéines immunogènes exprimées chez les plantes. Une limite inhérente à cette approche de vaccination orale est la barrière stomacale en égard du pH gastrique et de l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. La formulation des protéines végétales avec le carboxyméthyl amidon (CMA) comme excipient pallie à la dégradation des protéines le long du tractus gastro-intestinal et offre une libération progressive de celles-ci au niveau intestinal.

## INTRODUCTION

Il a été démontré, par analyse de profils électrophorétiques, que les protéines végétales sont assujetties à l'attaque protéolytique de la pepsine lors d'une incubation dans une solution simulant les conditions de pH gastrique. Une administration orale de protéines devient dès lors non envisageable sans l'utilisation d'un excipient approprié.

Le carboxyméthyl amidon (CMA) est obtenu par traitement de l'amidon avec de l'acide monochloroacétique [1]. Les propriétés de gastro-protection de cet excipient ont notamment été démontrées pour la formulation de protéines [2].

La région de l'intestin ciblée pour induire une réponse immunitaire se situe au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement dans l'iléon ou sont concentrés les plaques de Peyer. Une libération des protéines de l'extrait végétal au niveau de cette région de l'intestin est désirée afin que les protéines immunogènes entrent en interaction avec les cellules des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Les extraits de protéines de plants de luzerne (LPE) sont obtenus par broyage des organes photosynthétiques de la plante dans de l'azote liquide, suivi d'une lyophilisation du broyat obtenu.

### Synthèse de l'excipient polymérique:

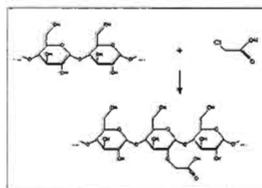
Le carboxyméthyl amidon [1] est synthétisé selon le protocole décrit récemment [2].

### Simulation des conditions gastro-intestinales

Milieu acide simulant les conditions gastriques (SGF/USP) avec et sans pepsine (Pep)

Milieu alcalin simulant les conditions intestinales (SIF/USP) avec et sans pancréatine (Pan)

## RÉSULTATS



Réaction de carboxyméthylation

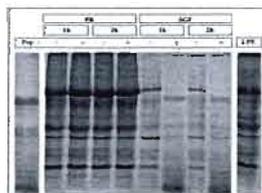


Figure 1 : Action de la pepsine (Pep) sur le LPE dans du SGF ou du tampon phosphate (PB)

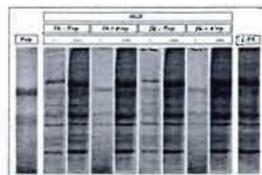
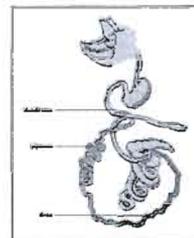


Figure 2 : Évaluation de la gastro-protection de LPE assurée par la matrice de CMA en comparaison avec LPE non protégé



Localisation des plaques de Peyer ponctuelles (orange) et continues (rouge) au niveau du tube digestif du porc.



Comprimé monolithique de 200, 300 et 400 mg contenant 25% d'extrait de protéines végétales de luzerne

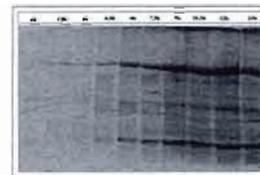


Figure 3 : Profil de dissolution de comprimés monolithiques de 300 mg, contenant 25% de LPE, dans du SIF sans pancréatine

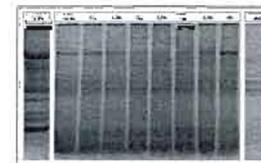


Figure 4 : Effet de la pancréatine (Pan) sur le LPE dans du SIF

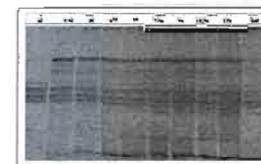


Figure 5 : Profil de dissolution de comprimés monolithiques de 300 mg, contenant 25% de LPE, dans du SIF avec pancréatine

## CONCLUSIONS

-La matrice de CMA est capable d'assurer la gastro-protection des protéines végétales.

-Une libération linéaire est observée en milieu intestinal à partir de comprimés de 300 mg contenant 25% d'extrait végétal.

-La pancréatine a une influence sur la vitesse de libération et sur le profil électrophorétique des protéines libérées.

## RÉFÉRENCES

- [1] H. D. Schell, M. Serban, M. A. Mateescu, T. Bentia, Rev. Roumaine Chim. 23 (1978) 1143-1147.
- [2] C. Calinescu, E. Nădejdu, J. Mulbacher, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, International Journal of Pharmaceutics, (2007) in press.

## REMERCIEMENTS

CRSNG, programme stratégique.  
FORNT: CRIP.



## **Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par voie orale.**

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup> et  
Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3</sup>.

(1) Université du Québec à Montréal, Département de Chimie; (2) Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques; (3) Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Plusieurs organismes pathogènes ont comme porte d'entrée dans l'organisme les muqueuses comme par exemple celles tapissant les tractus respiratoire et gastro-intestinal. Dans ce contexte, il est important, dans une procédure de vaccination, de cibler l'induction de l'immunité mucosale au site même de l'infection afin d'obtenir une protection optimale. L'objectif global de ce projet de recherche est d'induire une immunité mucosale par expression d'une protéine immunogène d'un organisme pathogène d'intérêt dans des plantes transgéniques comme vecteurs d'expression. Ces protéines végétales incluant des immunogènes peuvent ensuite être utilisées à des fins d'immunisation orale avec comme résultante une stimulation de l'appareil lymphoïde de la muqueuse intestinale et, sur la base du concept du système immunitaire commun aux muqueuses, de celui d'autres muqueuses comme celle du système respiratoire. Une limite inhérente à cette approche de vaccination orale est la barrière stomacale en égard du pH gastrique et de l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. Afin de palier à ce problème, il s'avère important de protéger les protéines immunogènes en incorporant les extraits végétaux dans une matrice polymérique utilisée à des fins de transport jusqu'à la muqueuse intestinale où la réponse immunitaire, via les interactions des cellules immunitaires s'y retrouvant (tissu lymphoïde associé aux muqueuses sous-jacentes ou GALT), pourra alors avoir lieu. Pour ce faire, les protéines végétales, contenant la protéine immunogène d'intérêt, doivent être formulées avec un excipient polymérique chargé de libérer les protéines au site d'action. L'excipient sélectionné est le carboxyméthyl amidon (CMA) qui offre, en plus de la protection gastrique et de la libération ciblée de l'actif au niveau intestinal (Calinescu et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2005), une stabilisation des protéines au sein du comprimé. L'étape de compression de la formulation sous forme de comprimés monolithiques de 200 mg, contenant 20 % d'extrait végétal préalablement lyophilisé, fut réalisée pendant 1 minute à la pression de 2,5 T/cm<sup>2</sup> dans un moule de 9 mm de diamètre. L'étude du profil électrophorétique des protéines végétales a démontré l'importance de la dégradation protéique issue du passage gastrique, d'où la nécessité de protéger les protéines avec le CMA. Après formulation de ces mêmes protéines avec l'excipient et simulation in vitro du passage gastrique, le profil électrophorétique des protéines végétales obtenu est comparable à celui des protéines avant formulation et traitement. D'autres expériences sont en cours afin de valider le concept de gastro-protection des protéines végétales et la libération de protéines immunogènes dans des conditions simulant l'environnement physiologique de l'intestin grêle. Cette technologie sera ensuite appliquée à un modèle d'infection virale porcine associée au virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc (VSRRP), une des infections porcines les plus importantes économiquement, le but étant d'induire une immunité mucosale spécifique à ce virus suite à l'immunisation par des protéines immunogènes virales exprimées chez la plante.

Ce projet est financé grâce à une subvention du CRSNG, programme stratégique.

*Colloque annuel des étudiants chercheurs en chimie et en biochimie de l'UQAM, 2008*

## **Formulation de protéines végétales avec matrices à base d'amidon à des fins vaccinales par voie orale**

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup> et  
Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3</sup>.

Université du Québec à Montréal (1) Département de Chimie; (2) Département des Sciences Biologiques;  
(3) Centre de Recherche Biomédicales (BioMed)

Plusieurs organismes pathogènes pénètrent dans l'organisme par les muqueuses de sorte qu'il est plausible de prévenir les infections qui y sont associées par l'induction de l'immunité mucoale avec des immunogènes d'intérêt. Une possibilité pour l'induction d'une immunité locale intestinale, est de faire appel à des vaccins oraux formulés à base de plantes transgéniques. Une limite inhérente à cette approche est la barrière stomacale, en égard du pH acide et de l'activité protéolytique locale qui peut détruire les immunogènes. Il s'avère ainsi important de protéger les protéines immunogènes en incorporant les extraits végétaux dans une matrice polymérique. Dans cette étude, l'excipient sélectionné a été le carboxyméthyl amidon (CMA) qui offre, en plus de la protection gastrique, la libération contrôlée du principe actif au niveau intestinal (Calinescu et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2005). Des comprimés monolithiques de 300 mg et de 9 mm de diamètre, contenant 25% d'extrait végétal préalablement lyophilisé, ont été obtenus par compression directe pendant 30 sec à une pression de 2,5 T/cm<sup>2</sup>. L'analyse des protéines formulées avec le CMA soumis à des conditions gastriques in vitro, a montré un profil électrophorétique des protéines récupérées comparable à celui obtenu avant la formulation. Par après, les protéines végétales formulées avec le CMA furent libérées dans un milieu simulant les conditions intestinales; la dissolution complète fut observée dans les 6 premières heures, accompagnée toutefois d'une dégradation des protéines végétales. Cette dégradation protéinique fut contrée par l'addition d'inhibiteurs de protéases dans le milieu de dissolution. L'étude de la libération de différentes charges en extrait végétal additionné de 0,5 % d'albumine bovine, a démontré une libération optimale avec une charge des comprimés de 30 % en extrait végétal. L'ensemble des résultats a montré le potentiel d'utilisation des comprimés CMA pour véhiculer du matériel immunogénique contenu dans des extraits de plantes. Des expériences sont actuellement en cours pour analyser l'effet de divers types d'inhibiteurs de protéases sur la préservation des protéines d'intérêt et pour vérifier l'activité fonctionnelle des immunogènes libérés à partir des comprimés CMA. Des expériences sont aussi planifiées afin d'utiliser des comprimés CMA à des fins de vaccination orale avec des extraits de plantes dans le but de prévenir différents types d'infections.

Ces travaux ont été financés grâce à une subvention du CRSNG, programme stratégique (D. Archambault, chercheur principal).

# Formulation de protéines végétales à des fins vaccinales par voie orale

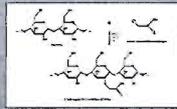
Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3</sup>, Fathey Sarhan<sup>2</sup> et Mircea Alexandru Mateescu<sup>1,3</sup>  
 (1) Université du Québec à Montréal, Département de Chimie; (2) Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques;  
 (3) Centre de recherches biomédicales (BioMed)

## RÉSUMÉ

Ce projet vise à développer un procédé de vaccination par voie orale contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur chez le porc (VSRSP) à base de protéines immunogènes exprimées chez les plantes. Une limite inhérente à cette approche de vaccination orale est la barrière stomacale en regard du pH gastrique et de l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. La formulation de protéines végétales avec le carboxyméthyl amidon (CMA) comme excipient pallie à la dégradation des protéines le long du tractus gastro-intestinal et offre une libération progressive de celles-ci au niveau intestinal.

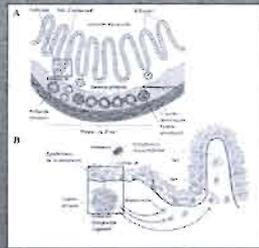
## INTRODUCTION

Le carboxyméthyl amidon (CMA) est obtenu par traitement de l'amidon avec de l'acide monochloroacétique [1]. Les propriétés de gastro-protection de cet excipient ont notamment été démontrées pour la formulation de protéines [2].



Réaction de carboxyméthylation de l'amidon

La libération des protéines végétales au niveau de l'intestin grâce à l'interaction des protéines immunogènes avec les cellules des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. La réponse immunitaire sera donc initiée par les plaques de Peyer.



Coupe schématisée de la muqueuse portant l'intestin grêle avec localisation des plaques de Peyer (A) et mécanisme de production d'IgA au niveau des sites d'induction (B)

## OBJECTIFS

- Assurer la protection des protéines végétales contre la dégradation gastrique.
- Assurer la libération des protéines végétales au niveau duo-jéjunum du petit intestin.
- Comparer l'effet de différents inhibiteurs de protéases au niveau intestinal.

## RÉSULTATS

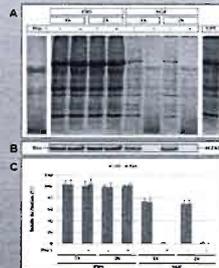


Figure 1 : Action de la pepsine (Pep) dans une solution simulée des conditions gastriques (SGF) ou du tampon phosphate (PBS) sur : (A) un extrait de protéines de laurine (LPE) et (B) la BSA incorporée (1% (w/w)) dans le LPE (LPEB), analyses densitométriques (C)

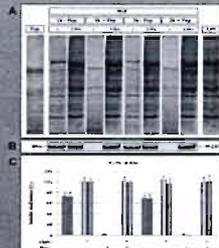


Figure 2 : Gastro-protection de LPE (A) et de la BSA dans LPEB (B) assurée par la matrice de CMA, analyses densitométriques (C)



Figure 3 : Effet de la Pancréatine (Pan) et de l'inhibiteur «Complete» (C) dans un milieu simulé des conditions intestinales (SIF) sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg ; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 25% en LPE (w/w), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 25% en LPE contenant 1% BSA (w/w) (LPEB)



Figure 4 : Effet de la charge en LPE sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg dans le milieu de dissolution SIF contenant l'inhibiteur «Complete» (BFC) ; (A) libération de protéines végétales pour des formulations contenant différentes charges en LPE, (B) libération de BSA pour des formulations contenant différentes charges en LPE dans lequel est ajoutée 1% BSA (w/w) (LPEB)



Figure 5 : Effet de différentes quantités (w/v) de l'inhibiteur «Complete» (C) dans le milieu de dissolution SIF sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg ; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 30% en LPE (w/w), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 30% LPE contenant 1% BSA (w/w) (LPEB)



Figure 6 : Effet de différentes quantités (w/v) de l'inhibiteur «Aprotine» (A) ajoutées dans les comprimés de 300 mg sur le profil de dissolution ; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 30% en LPE (w/w), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 30% LPE contenant 1% BSA (w/w) (LPEB)



Figure 7 : Effet de différentes quantités (w/v) de l'inhibiteur «Aprotine» (A) ajoutées dans les comprimés de 300 mg sur le profil de dissolution ; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 30% en LPE (w/w), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 30% LPE contenant 1% BSA (w/w) (LPEB)

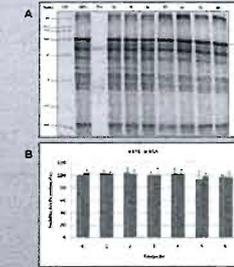


Figure 8 : Stabilisation de LPEB par l'inhibiteur «Protalbic»<sup>®</sup> 0,025% (w/v) dans le milieu SIF avec Pan pendant 6h (A), analyses densitométriques (B)

## CONCLUSIONS

- La matrice de CMA a le potentiel d'assurer la gastro-protection des protéines végétales.
- Les enzymes pancréatiques ont une influence sur la vitesse de libération et sur le profil électrophorétique des protéines libérées.
- La libération optimale des protéines est observée pour une charge de 30%.
- L'efficacité optimale de l'inhibiteur «Protalbic»<sup>®</sup> est observée à partir d'une quantité de 0,025% (w/v) dans le milieu SIF et de 1,5% (w/w) dans la formulation.
- La stabilisation des protéines est observée lors de l'ajout de 0,025% (w/v) de l'inhibiteur «Protalbic»<sup>®</sup> dans le milieu SIF les protéases de la pancréatine sont donc inhibées.
- L'efficacité de l'inhibiteur «Aprotine» est inférieure à celle observée pour le «Protalbic»<sup>®</sup>.

## RÉFÉRENCES

- [1] H. O. Schell, M. Serban, M.A. Mateescu, T. Berda, Rev. Roum. Chim. 23 (1978) 1143-1147.
- [2] C. Calinescu, E. Nadrau, J. Mulbacher, J.M. Fierbrother, M.A. Mateescu, Int. J. Pharm. 343 (2007) 18-25.

## REMERCIEMENTS

CRSNG, programme stratégique.

## **FORMULATION DE PROTÉINES VÉGÉTALES AVEC MATRICE DE CARBOXYMETHYL-AMIDON POUR LE DÉVELOPPEMENT DE VACCINS PAR VOIE ORALE**

De Koninck P<sup>1,3</sup>, Archambault D<sup>2,3</sup>, Sarhan F<sup>2</sup>, Hamel F<sup>1,2,3</sup>, Mateescu MA<sup>1,3</sup>

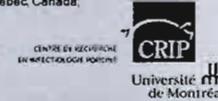
1Université du Québec à Montréal, Département de Chimie, Montréal, Québec, Canada;  
2Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques, Montréal, Québec, Canada; 3Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Plusieurs organismes pathogènes entrent dans l'organisme par les muqueuses, principalement intestinale et respiratoire, d'où l'intérêt de développer des vaccins muqueux comme par exemple des vaccins sous-unitaires à base de plantes transgéniques. Dans cette optique, les protéines végétales, incluant les immunogènes, pourraient être utilisées à des fins d'immunisation par voie orale. Une limite inhérente à cette approche est la barrière stomacale en égard du pH acide et de l'activité protéolytique pouvant dégrader les immunogènes. Des comprimés monolithiques contenant l'extrait de protéines végétales ont été obtenus par compression directe. Après un traitement simulant le passage gastrique, les profils électrophorétiques des protéines végétales ont montré l'importance de la dégradation protéique, d'où la nécessité de protéger les protéines immunogènes en incorporant l'extrait végétal dans une matrice polymérique, le carboxyméthyl amidon (CMA), chargée de libérer les protéines au site d'action. La libération subséquente des protéines sous des conditions expérimentales simulant le milieu intestinal a démontré la dissolution complète du comprimé dans les six premières heures, accompagnée de la dégradation des protéines végétales, d'où la nécessité d'ajouter des inhibiteurs de protéases. Une libération optimale en utilisant de tels inhibiteurs fut donc observée pour une charge de 30 % en extrait végétal. Des essais sont actuellement planifiés en vue de tester la validité de la technologie développée in vivo. Cette technologie pourra être appliquée à de nombreux pathogènes humains et animaux, notamment ceux affectant les porcs.

# Formulation de protéines végétales avec matrice d'amidon à des fins vaccinales par voie orale

Patrick De Koninck<sup>1,3</sup>, Denis Archambault<sup>2,3</sup>, Fathay Sarhan<sup>2</sup>, Francine Hamel<sup>1,2,3</sup> et Mirocea Alexandru Mateescu<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, Département de Chimie, Montréal, Québec, Canada; <sup>2</sup>Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques, Montréal, Québec, Canada; <sup>3</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

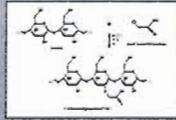


## RÉSUMÉ

Ce projet vise à développer un procédé de vaccination par voie orale contre des agents pathogènes qui attaquent les muqueuses en utilisant des protéines immunogènes exprimées chez les plantes. Une limite inhérente à cette approche de vaccination orale est la barrière stomacale en regard du pH gastrique et de l'activité protéolytique pouvant dégrader le matériel immunogène d'intérêt. La formulation de protéines végétales avec le carboxyméthyl amidon (CMA) comme occupant passif à la dégradation des protéines le long du tractus gastro-intestinal et offre une libération progressive de celles-ci au niveau intestinal.

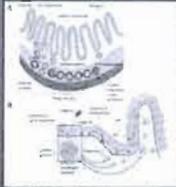
## INTRODUCTION

Le carboxyméthyl amidon (CMA) est obtenu par traitement de l'amidon avec du acide monochloroacétique [1]. Les propriétés de gastro-protection de cet occupant ont notamment été démontrées pour la formulation de protéines [2].



Réaction de carboxyméthylation de l'amidon

La libération des protéines végétales au niveau du l'intestin grêle permettra l'interaction des protéines immunogènes avec les cellules des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. La réponse immunitaire sera donc initiée par les plaques de Peyer.



Coupe schématique de la muqueuse bordant l'intestin grêle avec localisation des plaques de Peyer (A) et mécanisme de production d'IgA au niveau des sites d'induction (B) (Kuby et al., 2000)

## RÉFÉRENCES

- [1] H. D. Terrell, M. Sivilin, M.A. Matocescu, J. Berda, *New Research Chem* 23 (1975) 3143-1144
- [2] C. Calvetti, E. Nadeau, J. Milbrink, J. M. Fortin, M.A. Matocescu, *Int J Pharm*, 343 (2007) 18-25.

## OBJECTIFS

- Assurer la protection des protéines végétales contre la dégradation gastrique.
- Assurer la libération des protéines végétales au niveau l'ileo-jéjunum du petit intestin.
- Comparer l'effet de différents inhibiteurs de protéases au niveau intestinal.

## RÉSULTATS

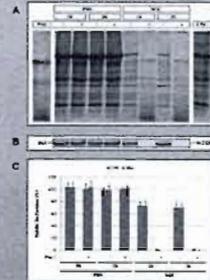


Figure 1 : Action de la papaïne (Pap) dans une solution simulant les conditions gastriques (SGF) ou du tampon phosphate (PBS) sur: (A) un extrait de protéines de lactosérum (LPE) et (B) la BSA incorporée (1% (w/v)) dans le LPE (LPEB); analyses densitométriques (C)

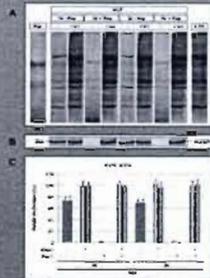


Figure 2 : Gastro-protection de LPE (A) et de la BSA dans LPEB (B) assurée par la matrice de CMA; analyses densitométriques (C)

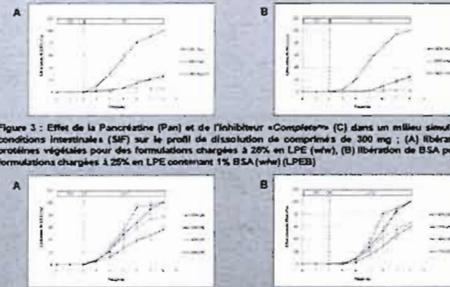


Figure 3 : Effet de la Pancreatine (Pan) et de l'inhibiteur «Complexe» (C) dans un milieu simulant les conditions intestinales (SIF) sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 25% en LPE (w/v), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 25% en LPE contenant 1% BSA (w/v) (LPEB)

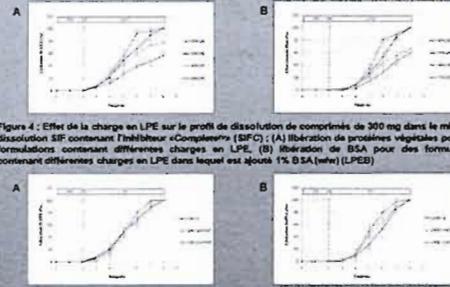


Figure 4 : Effet de la charge en LPE sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg dans le milieu de dissolution SIF contenant l'inhibiteur «Complexe» (SIFC); (A) libération de protéines végétales pour des formulations contenant différentes charges en LPE, (B) libération de BSA pour des formulations contenant différentes charges en LPE dans lequel est ajoutée 1% BSA (w/v) (LPEB)

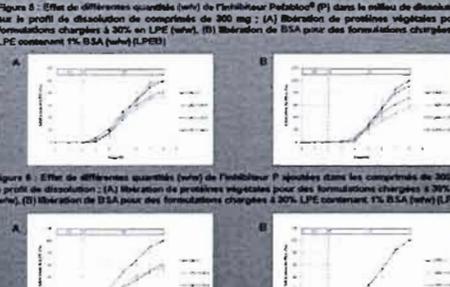


Figure 5 : Effet de différentes quantités (w/v) de l'inhibiteur Panbio® (P) dans le milieu de dissolution SIF sur le profil de dissolution de comprimés de 300 mg; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 30% en LPE (w/v), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 30% LPE contenant 1% BSA (w/v) (LPEB)



Figure 7 : Effet de différentes quantités (w/v) de l'inhibiteur Apronine® (A) ajoutées dans les comprimés de 300 mg sur le profil de dissolution; (A) libération de protéines végétales pour des formulations chargées à 20% en LPE (w/v), (B) libération de BSA pour des formulations chargées à 20% LPE contenant 1% BSA (w/v) (LPEB)

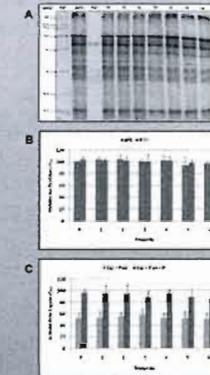


Figure 8 : Stabilisation de LPEB par l'inhibiteur Panbio® 0,025% (w/v) dans le milieu SIF avec Pan pendant 6h (A); analyses densitométriques (B). Mesure de l'activité de la lipase (Lip) pendant 6h dans le milieu SIF avec Pan en présence ou non de P 0,025% (w/v) (C)

## CONCLUSIONS

- La matrice de CMA a le potentiel d'assurer la gastro-protection des protéines végétales.
- Les enzymes pancréatiques ont une influence sur la vitesse de libération et sur le profil électrophorétique des protéines libérées.
- L'activité des protéases est contrôlée par l'inhibiteur Complexe™.
- La libération optimale des protéines est observée pour une charge de 30%.
- L'efficacité optimale de l'inhibiteur Panbio® est observée à partir d'une quantité de 0,025% (w/v) dans le milieu SIF et de 1,5% (w/v) dans la formulation.
- L'efficacité de l'inhibiteur Apronine® est inférieure à celle observée pour le Panbio®.
- La stabilisation des protéines et la conservation de l'activité enzymatique est observée lors de l'ajout de 0,025% (w/v) de l'inhibiteur Panbio® dans le SIF.

## REMERCIEMENTS

Recherche subventionnée par le CRISQ (Programme stratégique) de l'FRFC et le CMAA.