

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INRS - INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**Évaluation du potentiel d'une matrice protéique malléable de lactosérum fermenté
en tant qu'excipient pharmaceutique**

Par
Raúl Alberto Arroyo Galicia

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Charles Dozois, Ph.D.
Examinatrice externe	Muriel Subirade, Ph.D.
Directeur de recherche	Claude Dupont, Ph.D.
Codirecteur de recherche	François Shareck, Ph.D.

A mis padres, porque gracias a ustedes soy quien soy.

A mi querido México, que me vio nacer.

A Canada, por haber creído en mí.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
RÉSUMÉ	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 LA FORMULATION DE MÉDICAMENTS	4
1.1.1 La problématique de formulation de médicaments	4
1.2 LES MÉTHODES DE FABRICATION DE COMPRIMÉS	7
1.2.1 La granulation humide	8
1.2.2 La granulation sèche	9
1.2.3 La compression directe	9
1.3 LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE	10
1.3.1 La rhéologie des ingrédients	11
1.3.2 Les caractéristiques organoleptiques	11
1.3.3 Les dimensions des comprimés	12
1.3.4 Les poids des comprimés	12
1.3.5 La dureté des comprimés	12
1.3.6 La friabilité des comprimés	13
1.3.7 La désintégration des comprimés	13
1.3.8 L'uniformité du contenu	13
1.3.9 La dissolution des comprimés	14
1.3.10 La stabilité des comprimés	15

1.4	LES EXCIPIENTS	15
1.4.1	Les diluants	16
1.4.1.1	Le mannitol	17
1.4.1.2	Le saccharose	18
1.4.1.3	Le lactose	19
1.4.1.4	L'amidon	20
1.4.1.5	La cellulose microcristalline	21
1.4.2	Les désintégrants	22
1.4.2.1	Le glycolate sodique d'amidon	23
1.4.2.2	La croscarmellose sodique	24
1.4.2.3	L'alginate de sodium	25
1.4.2.4	La gomme guar	26
1.4.3	Les lubrifiants	26
1.4.3.1	Le stéarate de magnésium	27
1.4.3.2	Le talc	27
1.4.3.3	L'huile végétale hydrogénée	27
1.4.4	Les agglutinants	28
1.4.4.1	La gomme arabique	28
1.4.4.2	La gélatine	29
1.5	LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE	29
1.5.1	La production de la Matrice Protéique Malléable	29
1.5.2	Les propriétés de protéines et des peptides de lactosérum	30
1.5.3	Les propriétés des lactobacilles	32
1.5.4	Les propriétés des exopolysaccharides (EPS)	33
1.5.5	La MPM en tant qu'excipient	34

CHAPITRE 2 :	MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
2.1	CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA MPM EN TANT QU'EXCIPIENT	37
2.1.1	Rhéologie de la MPM lyophilisée	37
2.1.2	Production industrielle des comprimés de MPM	38
2.1.3	Évaluation du poids et de l'épaisseur des comprimés de MPM	39
2.1.4	Évaluation de la dureté et de la friabilité des comprimés de MPM	39
2.1.5	Évaluation de la désintégration des comprimés de MPM	41
2.2	ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM	41
2.3	ÉVALUATION VISUELLE DE LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE	42
2.3.1	Évaluation de la forme des particules de la MPM	42
2.3.2	Viabilité des bactéries dans la MPM	43
2.4	ÉTUDE CINÉTIQUE <i>IN VITRO</i> DE LA LIBÉRATION D'AGENTS THÉRAPEUTIQUES	44
2.4.1	Réalisation des comprimés à base de MPM	44
2.4.2	Préparation de solutions gastriques et intestinales	45
2.4.3	Cinétique de dissolution et dosage spectrophotométrique de l'acétaminophène	46
2.4.3.1	Cinétique de dissolution des comprimés dans la solution gastrique	46
2.4.3.2	Cinétique de dissolution des comprimés dans la solution intestinale	46

CHAPITRE 3 :	RÉSULTATS	47
3.1	CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA MPM EN TANT QU'EXCIPIENT	48
3.1.1	Rhéologie de la MPM lyophilisée	48
3.1.2	Caractéristiques physiques des comprimés de MPM	48
3.2	ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM	49
3.3	ÉVALUATION VISUELLE DE LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE	53
3.3.1	Évaluation de la forme des particules de la MPM	53
3.3.2	Viabilité des bactéries dans la MPM	54
3.4	ÉTUDE CINÉTIQUE <i>IN VITRO</i> DE LA LIBÉRATION D'AGENTS THÉRAPEUTIQUES	56
3.4.1	Étude de la cinétique de libération à partir des comprimés de MPM (Compression directe)	56
3.4.1.1	Cinétique de libération des comprimés de MPM dans la solution gastrique	57
3.4.1.2	Cinétique de libération des comprimés de MPM dans la solution intestinale	58
3.4.2	Étude de la cinétique de libération à partir des comprimés de MPM (Granulation humide)	59
3.4.2.1	Cinétique de libération des comprimés de MPM dans la solution gastrique	59
3.4.2.2	Cinétique de libération des comprimés de MPM dans la solution intestinale	60
3.4.3	Étude de la cinétique de libération à partir des comprimés de MPM avec des EPS (Granulation humide)	61
3.4.3.1	Cinétique de libération des comprimés de MPM avec des EPS dans la solution gastrique	62
3.4.3.2	Cinétique de libération des comprimés de MPM avec des EPS dans la solution intestinale	64

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	67
4.1 LA RHÉOLOGIE DE LA MPM	68
4.2 LES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DES COMPRIMÉS DE MPM	69
4.2.1 Le poids des comprimés	69
4.2.2 L'épaisseur des comprimés	70
4.2.3 La dureté des comprimés	71
4.2.4 La friabilité des comprimés	71
4.2.5 La désintégration des comprimés	72
4.3 LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM	72
4.4 LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE	73
4.5 LA LIBÉRATION DE L'ACÉTAMINOPHÈNE À PARTIR DES COMPRIMÉS DE MPM	75
CONCLUSION GÉNÉRALE	79
REMERCIEMENTS / AGRADECIMIENTOS	81
BIBLIOGRAPHIE	82
ANNEXE 1	90

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I :	Formes pharmaceutiques et voies d'administration	page 5
TABLEAU II :	Principales étapes des méthodes de fabrication de comprimés	page 8
TABLEAU III :	Caractéristiques de la presse Manesty F3 et des Comprimés	page 39
TABLEAU IV :	Formulations des comprimés à base de MPM	page 45
TABLEAU V :	Caractéristiques rhéologiques des lots de MPM	page 48
TABLEAU VI :	Caractéristiques physiques des comprimés de MPM	page 49
TABLEAU VII :	Stabilité des comprimés de MPM	page 50
TABLEAU VIII :	Analyses statistiques de la stabilité des comprimés de MPM	page 52
TABLEAU IX :	Formulations des comprimés de MPM fabriqués par compression directe	page 56
TABLEAU X :	Formulations des comprimés de MPM fabriqués par granulation humide	page 59
TABLEAU XI :	Formulations des comprimés de MPM avec des EPS fabriqués par granulation humide	page 62
TABLEAU XII :	Indice de Carr – Indices d'écoulement	page 68
TABLEAU XIII :	Indice de Carr d'excipients sur le marché	page 69

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	Projection de Fischer du mannitol	page 17
FIGURE 2 :	Représentation stéréochimique du saccharose	page 18
FIGURE 3 :	Représentation stéréochimique des isomères du lactose	page 19
FIGURE 4 :	Représentation stéréochimique de l'amidon	page 21
FIGURE 5 :	Représentation stéréochimique de la cellulose Microcristalline	page 22
FIGURE 6 :	Représentation stéréochimique du glycolate sodique d'amidon	page 24
FIGURE 7 :	Représentation stéréochimique de la croscarmellose sodique	page 25
FIGURE 8 :	Vander Kamp Tap density tester	page 38
FIGURE 9 :	Presse Manesty Single Punch F3	page 38
FIGURE 10 :	Pharma test type PTB 301	page 40
FIGURE 11 :	VanKel Friabilator	page 40
FIGURE 12 :	Vander Kamp Disintegration tester	page 41
FIGURE 13 :	Presse Carver	page 44
FIGURE 14 :	Fermenteur BioFlo Mocel C30	page 46
FIGURE 15 :	MPM humide coloration Sypro Orange	page 53
FIGURE 16 :	MPM lyophilisée coloration Sypro Orange	page 54
FIGURE 17 :	MPM-EPS lyophilisées coloration Sypro Orange	page 54
FIGURE 18 :	MPM humide coloration BacLight	page 55
FIGURE 19 :	MPM lyophilisée coloration BacLight	page 55
FIGURE 20 :	MPM-EPS lyophilisées coloration BacLight	page 56

FIGURE 21 :	Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM faits par compression directe	page 57
FIGURE 22 :	Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM faits par compression directe	page 58
FIGURE 23 :	Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM faits par granulation humide	page 60
FIGURE 24 :	Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM faits par granulation humide	page 61
FIGURE 25 :	Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM à faible concentration d'EPS faits par granulation humide	page 63
FIGURE 26 :	Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM à haute concentration d'EPS faits par granulation humide	page 64
FIGURE 27 :	Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM à faible concentration d'EPS faits par granulation humide	page 65
FIGURE 28 :	Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM à haute concentration d'EPS faits par granulation humide	page 66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANOVA :	Analysis of variance
EPS :	Exopolysaccharides
g :	Gramme
GRAS :	Generally recognized as safe
IC :	Indice de Carr
KH_2PO_4 :	Phosphate de potassium dibasique
KN :	Kilo Newton
mg :	Milligramme
mm :	Millimètre
MPM :	Matrice Protéique Malléable
μL :	Micro litre
NaCl :	Chlorure de calcium
nm :	Nanomètre
p/p :	Poids sur poids
p/v :	Poids sur volume
rpm :	Révolution par minute
SGF :	Simulated Gastric Fluid
SIF :	Simulated Intestinal Fluid
USP :	United States Pharmacopeia
UV :	Ultraviolet

RÉSUMÉ

Actuellement, il existe une problématique dans le domaine pharmaceutique. Certains médicaments sont administrés par injection dû à la faible protection qu'offre la voie orale (dégradation du principe actif dans le système digestif) [1,2]. Malheureusement la voie intraveineuse n'est pas la voie la plus confortable, surtout pour les patients qui ont une maladie chronique et qui requièrent un traitement continu et à long terme avec ce médicament. Alors, il est devenu important de développer de nouveaux systèmes de délivrance médicamenteux qui nous permettront de cibler ou prolonger l'action du principe actif administré par la voie orale.

Des travaux antérieurs ont montré qu'il était possible d'obtenir une matrice appelée MPM (Matrice Protéique Malléable) suite à la fermentation du lactosérum par des lactobacilles [3]. Grâce à ses caractéristiques fonctionnelles, ce produit est en voie d'utilisation dans le secteur alimentaire. Étant donné que la majorité des constituants de la MPM (protéines et peptides de lactosérum, exopolysaccharides bactériens, bactéries lactiques et calcium) sont tous reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé, ce produit a un fort potentiel nutraceutique et de stimulation du système immunitaire [4,5,6].

Une autre application potentielle des MPM, une fois séchées par lyophilisation, est son utilisation en formulation de médicaments. Étant donné que les MPM sont constituées entre autres de protéines, d'exopolysaccharides et de lactose (tous des ingrédients utilisés dans l'industrie pharmaceutique), elles ont le potentiel d'être utilisées pour immobiliser ou pour encapsuler les principes actifs [7]. Grâce à leurs constituants, elles peuvent être utilisées pour lier et protéger des principes actifs dans l'environnement gastrique aux conditions physiologiques sévères comme les hautes teneurs en sels biliaires et les conditions acides des sucs digestifs [8,9,10]. Les MPM peuvent donc servir d'excipient pour la formulation de divers médicaments en offrant la possibilité de synergiser avec le principe actif grâce aux propriétés biologiques intrinsèques de leurs composantes individuelles.

Le but du présent projet est d'évaluer le potentiel de la MPM en tant qu'excipient pour formuler des principes actifs de haute valeur commerciale et produire ainsi des formes orales sèches à libération prolongée en utilisant l'acétaminophène comme traceur hydrophile. Des critères de contrôle de qualité, dont la forme des particules, les propriétés rhéologiques, la dissolution ainsi que la stabilité des formulations ont été évalués selon les méthodes standards de l'industrie pharmaceutique.



Étudiant



Directeur de recherche



Codirecteur de recherche

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 LA FORMULATION DE MÉDICAMENTS

La réussite constante ainsi que la survie d'une compagnie dans le domaine pharmaceutique dépend considérablement du développement de médicaments [11]. Puisqu'il y a une augmentation du nombre de médicaments avec des indications thérapeutiques extrêmement variées, il devient donc essentiel d'avoir une bonne compréhension de leurs effets, de leur métabolisme ainsi que de leur toxicité pour les administrer adéquatement en évitant les risques associés aux effets secondaires [12].

Les systèmes de libération prolongée des principes actifs sont une option pour réduire ou éliminer les effets secondaires reliés à une surdose du principe actif [13]. Grâce à l'apport de ces systèmes, plusieurs principes actifs ayant jadis été mis à l'écart peuvent désormais être formulés. Il faut mentionner que même si ces systèmes de libération s'appliquent à toutes les voies d'administration, la voie orale est actuellement la plus employée [13].

1.1.1 LA PROBLÉMATIQUE DE LA FORMULATION DE MÉDICAMENTS

Il y a plusieurs voies d'administration de médicaments. Le premier critère pour sélectionner la voie d'administration est principalement le lieu d'absorption et ainsi, choisir la forme pharmaceutique la plus appropriée [14]. Il faut mentionner que la vitesse d'absorption de l'agent thérapeutique dépend de la forme pharmaceutique et de la voie d'administration. Le tableau I présente les voies d'administration ainsi que les formes pharmaceutiques les plus connues.

Les principes actifs sont rarement administrés dans l'état chimiquement pur et ils sont normalement formulés avec un ou plusieurs excipients avant d'être mis sur le marché. Les excipients sont des ingrédients inertes biologiquement ajoutés à la formulation pour améliorer les propriétés physiques des formes pharmaceutiques [15]. Cela fait varier la présentation d'une simple solution à un système complexe de délivrance médicamenteux. Il est donc nécessaire d'appliquer les meilleures technologies pour développer et produire les

médicaments, de même que pour contrôler la stabilité et l'efficacité des formulations lors du développement de nouveaux produits [16].

Tableau I : Formes pharmaceutiques et voies d'administration (tiré de [14]).

	Cutané	Injection	Nasale	Oculaire	Orale	Rectale	Vaginale
Bandes adhésives	x						
Capsules					x		
Comprimés					x		x
Crèmes	x						
Elixirs					x		
Éponges							x
Gels					x		
Lotions	x						
Magmas					x		
Onguents	x			x		x	x
Pâtes	x						
Pompes à infusion	x						
Poudres	x				x		
Sirops					x		
Solutions		x	x	x	x	x	x
Suppositoires						x	x
Suspensions		x		x	x		
Vaporisateurs			x				

Pour l'industrie pharmaceutique, la biodisponibilité suite à une administration orale a toujours été un facteur limitant dans le développement d'agents thérapeutiques [1]. Un composé rapidement absorbé manifeste son effet promptement. Cela peut devenir une problématique, car l'action peut être de courte durée. Ces médicaments doivent donc être administrés à intervalles plus rapprochés si l'on désire un effet continu. Par ailleurs,

plusieurs médicaments sont formulés par injection dû à leur faible biodisponibilité sous formes orales [2]. Malheureusement la voie intraveineuse n'est pas la voie la plus confortable, surtout pour les patients qui ont une maladie chronique et qui requièrent un traitement continu et à long terme avec ce médicament.

De nos jours, les médicaments existent majoritairement sous la forme de comprimés [12]. La justification se base sur le fait que la voie orale offre aux patients plus de confort lors de l'administration du médicament et sur la diminution des risques de contamination croisée et de blessures causées par des injections répétitives [18]. Parmi les désavantages rencontrés lors de l'administration orale, on retrouve : une réponse plus lente au traitement; la possibilité d'avoir une absorption irrégulière résultant de la présence ou non de nourriture dans le tractus gastro-intestinal ou une destruction du médicament causée par l'acidité de l'estomac et/ou par les enzymes retrouvés dans le tractus gastro-intestinal [16].

Du point de vue industriel, les comprimés sont la forme pharmaceutique la moins compliquée à produire à grande échelle [17]. Le principe de fabrication des comprimés est très simple, mais la réalisation reste complexe. Il n'est pas suffisant de placer une dose de poudre dans une presse et de la comprimer. Pour obtenir un comprimé, il est nécessaire que les composants aient certaines propriétés mécaniques très spécifiques. Les propriétés physiques des formulations (écoulement, compressibilité, etc.) dépendent fortement des excipients choisis ainsi que de leur concentration [15]. De nouveaux mélanges d'excipients sont continuellement développés pour répondre à la demande d'amélioration des propriétés des formes pharmaceutiques [15].

Il faut donc développer de nouveaux excipients qui permettront la prise de médicaments par la voie orale en intensifiant la stabilité du principe actif, en augmentant leur biodisponibilité et en réduisant les effets secondaires. Tout cela commence avec l'étape de pré-formulation où il faut prendre en considération les incompatibilités parmi les ingrédients ainsi que leurs propriétés rhéologiques [19]. Après diverses approximations successives de perfectionnement, la formule définitive est finalement mise au point.

1.2 LES MÉTHODES DE FABRICATION DE COMPRIMÉS

Les comprimés sont des formes pharmaceutiques orales préparées par la compression d'une formulation contenant un principe actif et des excipients sélectionnés pour améliorer les propriétés du produit [16,17]. Pour qu'une formulation pharmaceutique soit transformée en comprimé, il est nécessaire que les ingrédients aient certaines caractéristiques physiques à l'image d'un bon écoulement, d'une bonne cohésion et d'une bonne lubrification [16]. Comme la plupart des matériaux n'ont pas tous ces propriétés, des méthodes de fabrication ont été conçues pour impartir ces caractéristiques aux matériaux à comprimer.

Il existe trois méthodes de fabrication de comprimés; la granulation humide, la granulation sèche et la compression directe [16,17]. La première étape en commun à toutes les méthodes de fabrication est le mélange du principe actif avec un ou plusieurs excipients [16]. Les procédés de granulation humide et sèche ont été explicitement conçus pour améliorer l'écoulement et la compressibilité des poudres [17]. Lorsque la formulation obtient les propriétés d'écoulement et de compressibilité désirées, les ingrédients sont pressés pour produire ainsi les comprimés . Cette dernière étape est connue sous le nom de compression directe [17]. Le tableau II résume les principales étapes des différentes méthodes de fabrication des comprimés.

Chaque méthode a ses propres avantages et désavantages, applications spécifiques et restrictions particulières. La compression directe est la méthode de fabrication la plus simple [17]. La granulation humide est la méthode la plus utilisée dans le domaine pharmaceutique [17]. L'application de la granulation sèche est limitée aux situations où ni la granulation humide ou la compression directe ne peuvent être utilisées [17].

Tableau II : Principales étapes des méthodes de fabrication de comprimés (tiré de [17]).

GRANULATION HUMIDE	GRANULATION SÈCHE	COMPRESSION DIRECTE
1. Mélange du principe actif et d'excipients	1. Mélange du principe actif et d'excipients	1. Mélange du principe actif et d'excipients
2. Mélange humide des ingrédients	2. Pré-compression	2. Tamisage
3. Granulation	3. Moulinage	3. Compression
4. Séchage	4. Tamisage	
5. Moulinage	5. Compression	
6. Tamisage		
7. Compression		

1.2.1 LA GRANULATION HUMIDE

La granulation humide est la méthode d'élaboration de comprimés la plus ancienne et la plus couramment utilisée [17]. Elle est une méthode laborieuse avec plusieurs étapes de fabrication et, par conséquent, les coûts de production sont élevés [16].

Le procédé de granulation humide prétend transformer les particules petites et irrégulières en particules plus grandes et homogènes appelées granules en utilisant l'humidité (mélange humide des ingrédients) et la chaleur (séchage) durant le processus [17]. Ces granules sont de forme sphérique coulant librement et facilitant la compression du produit.

Cette méthode permet de modifier les propriétés physiques de certains médicaments avec des problèmes d'écoulement et de compressibilité, ce qui facilite leur compression [17]. D'autres avantages de la granulation humide sont l'incorporation de façon homogène de divers ingrédients et l'obtention de bonnes propriétés d'écoulement [16,17]. Cette méthode prévient aussi la ségrégation des composants [17].

Le principal désavantage de cette méthode est le coût élevé de production dû aux nombreuses étapes impliquées, au temps, à l'équipement, à l'énergie et aux espace requis [16,17].

1.2.2 LA GRANULATION SÈCHE

La granulation sèche est un procédé continu où la taille des particules est augmentée, mais contrairement à la granulation humide la chaleur et l'humidité ne sont pas utilisées [16]. Cette méthode est employée lorsque la compression directe n'est pas possible due aux mauvaises propriétés de la formulation et quand la granulation humide ne peut pas être utilisée, en raison d'un principe actif sensible à l'humidité ou à la chaleur [17].

La granulation sèche est un procédé qui réside en la création d'agglomérats appelés lingots, qui sont désintégrés par la suite [17]. On obtient alors un granulé plus uniforme que l'initial qui pourra être comprimé très facilement. À titre d'exemple, la granulation sèche a été utilisée pour la formulation de l'aspirine et certains produits effervescents [17].

Le principal avantage de cette méthode est la réduction du nombre d'équipement et des espaces requis ainsi que la diminution des coûts de production et du temps du procédé. Cependant, la granulation sèche présente quelques désavantages comme une quantité élevée de matériel à recycler et des risques de ségrégation des composants [17].

1.2.3 LA COMPRESSION DIRECTE

Le terme compression directe est utilisé pour définir le procédé par lequel un mélange de principe actif et d'excipients est pressé pour former des comprimés sans avoir besoin d'un pré traitement de granulation [16,17]. Cette méthode a été développée à partir des années 50 grâce à la découverte de nouveaux excipients avec des propriétés particulières dont le lactose séché par vaporisation, la cellulose microcristalline ainsi que l'amidon Sta-Rx [17].

La compression directe présente plusieurs avantages. L'économie est l'avantage le plus évident de cette méthode. Il est possible de réduire le temps du processus ainsi que les coûts de production en réduisant les étapes du procédé, les équipements requis et la consommation d'énergie [16,17,20]. Un autre avantage est l'élimination de problèmes dus au chauffage et à l'humidité, surtout si le principe actif est sensible à ces paramètres [17]. En

conséquence, cette méthode peut améliorer la stabilité physique du produit [16]. Finalement, la compression directe est suggérée pour la fabrication de médicaments à libération rapide car elle permet d'optimiser la désintégration de comprimés [17].

Il est important de mentionner que le choix des excipients est une étape cruciale dans la formulation de comprimés par compression directe. Les problèmes qui peuvent être occasionnés par un mauvais choix sont une faible dureté des comprimés à haute teneur en ingrédient actif ainsi qu'une distribution hétérogène à basse dose du principe actif due à la ségrégation [17].

1.3 LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

Les contrôles physico-chimiques du processus de formulation permettent à l'industrie pharmaceutique de réaliser les ajustements nécessaires au produit pendant la fabrication en détectant tout paramètre qui ne se retrouve pas dans les spécifications établies [16]. Dans ce sous-chapitre, on présentera les principaux paramètres que l'industrie pharmaceutique vérifie sur chaque lot de production pour ratifier sa bonne élaboration et sa bonne qualité tout en se basant sur les recommandations des principales pharmacopées.

Les pharmacopées sont des abrégés établis par des autorités gouvernementales pour fournir des spécifications de qualité de médicaments et d'établir les conditions générales concernant leur composition. Les règles fixées par les pharmacopées constituent la base pour établir les requêtes de qualité relatives à la forme finale de chaque préparation biologique [21,22]. En plus, la plupart des pharmacopées offrent aussi des références pour conseiller les pharmaciens sur la composition, le dosage, la voie d'administration, le stockage et l'étiquetage des médicaments. Les méthodes d'analyse des formes pharmaceutiques sont aussi bien décrites dans ces abrégés [22].

1.3.1 LA RHÉOLOGIE DES INGRÉDIENTS

La rhéologie est l'étude physique des poudres. Chaque poudre possède ses propres caractéristiques rhéologiques. L'écoulement des poudres représente une des caractéristiques physiques les plus importantes en fabrication pharmaceutique puisqu'elle va déterminer si des problèmes de formulation se produiront lors de la fabrication [23]. Les propriétés d'écoulement sont généralement analysées en utilisant des mesures comme la densité et l'indice de Carr [23,24]. Il a été démontré que la forme de la particule ainsi que la distribution de la taille affectent les propriétés rhéologiques [23]. Par conséquent, la distribution de la taille des cristaux et l'hygroscopicité des ingrédients utilisés dans la formulation auront une influence drastique au niveau des propriétés d'écoulement.

1.3.2 LES CARACTÉRISTIQUES ORGANOLEPTIQUES

L'évaluation des caractéristiques organoleptiques (couleur, texture, odeur, goût et apparence) joue un rôle important dans le développement des comprimés [17]. Il est nécessaire d'avoir une terminologie, des standards comparatifs et des conditions d'évaluation bien définies pour éviter la subjectivité dans ce genre d'évaluation [17]. L'observation des caractéristiques organoleptiques de n'importe quelle forme pharmaceutique peut donner une bonne idée de son état [25]. Également, elles peuvent faciliter l'identification concrète d'un médicament, en évitant de possibles confusions. Dernièrement, dû à l'importante croissance des stratégies de mise en marché, les caractéristiques organoleptiques ont pris considérablement d'intérêt [25].

1.3.3 LES DIMENSIONS DES COMPRIMÉS

Le contrôle des dimensions externes du comprimé (généralement le diamètre et l'épaisseur) est important pour la confirmation de la bonne qualité du lot fabriqué. En fait, l'homogénéité des dimensions démontre l'homogénéité du poids du comprimé ainsi que l'uniformité du contenu du principe actif [16]. Dans la littérature scientifique, les limites acceptables du comprimé en regard de son diamètre sont les suivantes : pour les diamètres inférieurs à 12.5 mm, il est admis d'avoir une variation maximale de 5 % et pour les diamètres supérieurs à 12.5 mm, la variation permise est de 3 % [25].

1.3.4 LE POIDS DES COMPRIMÉS

L'essai de poids est décrit dans les pharmacopées comme le contrôle de qualité à effectuer sur la plupart des formes pharmaceutiques [16]. En général, le poids du comprimé se trouve intimement lié avec le contenu du principe actif. L'importance de cet essai réside dans l'avantage que c'est une analyse de réalisation simple qui fournit une information rapide et adéquate de la qualité du comprimé [25].

1.3.5 LA DURETÉ DES COMPRIMÉS

L'essai de dureté, même s'il ne se trouve pas décrit dans la plupart des pharmacopées, joue un rôle significatif dans les procédures de contrôle de qualité et de développement des formulations [25,26]. Cette analyse évalue la force requise pour écraser un comprimé en appliquant sur celui-ci une force diamétrale. La résistance du comprimé à l'écrasement, à l'érosion et à la rupture dans les conditions d'entreposage, de transport et de manipulation dépend de sa dureté [16]. Un facteur influençant la dureté des comprimés est la taille des particules. Selon la littérature scientifique, les particules plus petites produisent des comprimés plus durs [27]. La détermination de la dureté est importante car un comprimé très dur ne va pas se désintégrer dans la période de temps requise. Par contre, si le comprimé est très mou, il ne sera pas capable de supporter les conditions d'entreposage et de manipulation suite à sa fabrication[16].

1.3.6 LA FRIABILITÉ DES COMPRIMÉS

La friabilité évalue la capacité des comprimés à résister aux forces tangentielles avec une faible perte de substance [25]. Il s'agit d'observer le degré d'érosion et d'exfoliation d'un lot de comprimés pour quantifier les pertes dues à des agressions externes durant l'entreposage, le transport et la manipulation [16]. La friabilité, s'exprime comme étant la perte de poids d'un comprimé dans un période de temps donné. La perte de poids maximale acceptable pour la plupart des produits est de 1 % [28].

1.3.7 LA DÉSINTÉGRATION DES COMPRIMÉS

La désintégration évalue le temps requis pour défaire un comprimé dans des conditions spécifiques et, par conséquent, il est le reflet de sa biodisponibilité (capacité du comprimé de libérer le principe actif dans l'organisme) [25]. La désintégration est considérée comme terminée lorsqu'il ne reste plus de résidus dans le tamis [16,24]. Si on travaille avec des comprimés non enrobés, de l'eau est utilisée comme milieu de désintégration. L'essai de désintégration est utilisé comme un contrôle pour la plupart des comprimés à l'exception des comprimés à croquer et des comprimés à libération prolongée [16]. La pharmacopée américaine (USP) établie que pour les comprimés non enrobés, la désintégration totale du comprimé doit être effectuée en 30 minutes ou moins pour les médicaments à libération immédiate [24].

1.3.8 L'UNIFORMITÉ DU CONTENU

L'essai de l'uniformité du contenu a comme but de démontrer la posologie homogène du lot fabriqué (assurer que chaque lot contient la dose de principe actif que théoriquement il doit contenir) selon les limites établies par les pharmacopées. Cette analyse est valide si le contenu individuel de chaque unité est compris entre 85 et 115% du contenu moyen [25].

1.3.9 LA DISSOLUTION DES COMPRIMÉS

Les essais de dissolution ont été utilisés dans l'industrie pharmaceutique pendant plus de 40 ans et ils sont officiels dans la *United States Pharmacopeia* (USP) depuis le début des années 1960 [29]. De façon générale, les essais de dissolution *in vitro* sont importants pour : assurer le contrôle du procédé; déterminer la stabilité des caractéristiques de libération du produit; et faciliter l'identification des modifications nécessaires à la formulation ou au procédé de fabrication [13].

Les essais de dissolution *in vitro* servent d'outil important pour caractériser la qualité biopharmaceutique d'un produit (le principe actif doit être solubilisé dans le tractus gastro-intestinal pour être absorbé) [16,30]. Pour les médicaments hydrosolubles, les milieux de dissolution appropriés sont de l'eau, une solution tampon diluée, une simulation de sucs gastriques (SGF) et/ou une simulation de sucs intestinaux (SIF) avec ou sans enzymes [30].

Plusieurs procédures ont été proposées pour déterminer les taux de dissolution des principes actifs des comprimés. Il y a trois types d'appareils officiellement reconnus: Appareil 1 (USP *basket method*), Appareil 2 (USP *paddle method*) et Appareil 3 (*modified disintegration equipment method*) [16].

Dans les premières étapes de développement du médicament, les propriétés de dissolution *in vitro* donnent un support pour choisir parmi les différentes alternatives de formulation ainsi que pour l'évaluation des ingrédients actifs [31]. Les données obtenues, suite aux essais de dissolution, aident à évaluer et à interpréter les risques possibles tels que les interactions avec d'autres médicaments, ce qui rend les essais de dissolution *in vitro* importants pour le développement du médicament ainsi que pour l'assurance de qualité [31]. Les données tirées des essais de dissolution *in vitro* sont importantes aussi pour évaluer le changement d'un procédé de fabrication et pour savoir si d'autres études de biodisponibilité sont requises [31].

1.3.10 LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS

La stabilité est la capacité d'un médicament à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans les limites spécifiées tout au long de sa durée de conservation [32]. La stabilité des produits pharmaceutiques dépend des facteurs environnementaux, tels que la température, l'humidité, la lumière ainsi que d'autres facteurs liés à la nature du produit comme les propriétés chimiques et physiques du principe actif et des excipients, la forme pharmaceutique, le procédé de fabrication et les propriétés de l'emballage [32,33]. Les essais de stabilité peuvent être réalisés de deux façons : en temps réel ou en temps accéléré [33].

Les essais de stabilité en temps réel sont des expériences qui ont pour but d'évaluer les propriétés physico-chimiques des médicaments sous des conditions d'entreposage ressemblant autant que possible aux conditions réelles d'entreposages prévues dans le réseau de distribution [33]. Les essais de stabilité accélérés sont des expériences conçues pour augmenter le taux de dégradation chimique et d'altération physique d'un médicament en le soumettant à des conditions d'entreposage excessives. Dans ces essais, on travaille à de hautes températures (40-60°C) pour une période de 3-6 mois [33].

1.4 LES EXCIPIENTS

Les principes actifs sont normalement administrés de façon orale sous la forme de comprimés et de capsules [17]. Il faut aussi ajouter des additifs sans activité médicinale pour rehausser l'apparence, améliorer la stabilité et aider la désintégration après l'administration [16]. Ces composants sont connus dans le domaine pharmaceutique sous le nom d'excipients.

Les excipients sont généralement les constituants majoritaires des comprimés [34]. Les propriétés fonctionnelles des excipients affecteront quatre aspects différents du médicament: la stabilité, les caractéristiques physiques, l'absorption *in vivo* ainsi que la production [34,35]. Ils doivent posséder certaines propriétés spécifiques comme: porosité, densité et écoulement pour réussir à cibler l'action du principe actif [16,17]. Ce groupe de caractéristiques joue un rôle très important dans la formulation des comprimés, spécialement dans le procédé de compression directe [17].

Les excipients sont des ingrédients importants dans la formulation et ils peuvent avoir des interactions avec les principes actifs [36]. C'est pour cette raison qu'aux États-Unis les excipients doivent être reconnus en tant que *generally recognized as safe* (GRAS) pour être utilisés par l'industrie pharmaceutique [34]. Une caractérisation des attributs des excipients sélectionnés est cruciale dans le processus de développement de la formulation [34].

Les excipients peuvent être classés en quatre catégories selon leur fonction dans la formulation: diluants, désintégrants, lubrifiants et agglutinants [37].

1.4.1 LES DILUANTS

Les diluants sont des substances de remplissage, sans activité pharmacologique, ajoutés pour donner au comprimé une taille appropriée [37]. Ils sont sélectionnés en fonction de leur propriétés de compression, leur solubilité et leur alcalinité ou acidité [37]. Ces propriétés dépendront de plusieurs facteurs dont la forme et la structure macro et microscopique des cristaux.

Bien que les diluants soient normalement considérés comme des ingrédients inertes, ils peuvent significativement affecter les propriétés biopharmaceutiques du comprimé [17]. L'exemple classique sont les sels de calcium qui interfèrent avec l'absorption de la tétracycline dans le tractus gastro-intestinal [16,17]. Ainsi, certains diluants classiques tels

que le lactose et l'amidon ont été modifiés dernièrement pour fournir des propriétés optimales [17].

Parmi les diluants les plus utilisés dans l'industrie pharmaceutique, on retrouve les sucres comme le mannitol, le saccharose et le lactose (l'excipient le plus utilisé) ainsi que des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose microcristalline [18].

1.4.1.1 Le mannitol

Le mannitol (figure 1) est un polyol (isomère du sorbitol) couramment utilisé dans les industries pharmaceutiques et alimentaires [15,17]. Dans les préparations pharmaceutiques, il est généralement utilisé comme diluant (10-90 % p/p) pour la formulation de comprimés car il n'est pas hygroscopique. Par conséquent, il peut être utilisé avec des principes actifs sensibles à l'humidité [15].

Le mannitol est particulièrement utilisé comme excipient dans la fabrication de comprimés à croquer car il ne présente pas d'odeur et il a un goût sucré semblable à celui du glucose tout en donnant une sensation de fraîcheur [15,17]. Administré par voie orale, le mannitol n'est pas absorbé dans le tractus gastro-intestinal. Mais, à grande dose, il peut causer de la diarrhée osmotique [15].

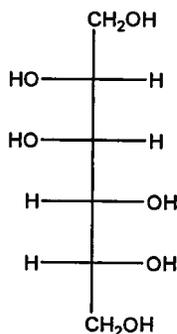


Figure 1. Projection de Fischer du mannitol

1.4.1.2 Le saccharose

Le saccharose (figure 2) est constitué de cristaux sans couleur et sans odeur de saveur sucré [15,17]. Le saccharose est utilisé comme diluant dans la granulation humide et la compression directe [15]. Il est aussi utilisé pour conférer un goût sucré aux comprimés à croquer [15,17]. Les comprimés à haute teneur en saccharose vont présenter une dureté élevée et une faible désintégration [15,17].

En raison de la non-toxicité et de la biodégradabilité du saccharose, des esters de saccharose sont fréquemment utilisés dans des formulations cosmétiques [15]. Par contre, dû au potentiel de provoquer des caries en comparaison à d'autres hydrates de carbone, l'utilisation du saccharose en formulations pharmaceutiques orales est en déclin [15].

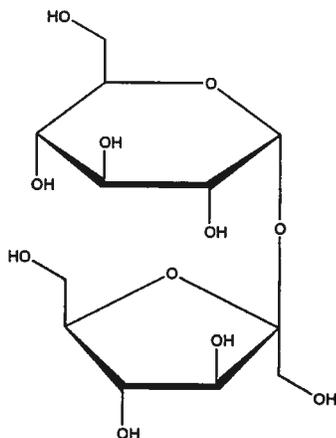


Figure 2. Représentation stéréochimique du saccharose

1.4.1.4 L'amidon

L'amidon (figure 4) est un polysaccharide constitué d'amylose (chaîne linéaire) et d'amylopectine (chaîne ramifiée) [38]. Il se présente sous forme de poudre blanche, inodore et sans saveur dont la forme ressemble à de petits granules sphériques ou ovoïdes selon la variété botanique [17]. Tous les amidons sont hygroscopiques et par conséquent, ils absorbent rapidement l'humidité de l'environnement [15]. L'amidon est extrait de diverses plantes en utilisant plusieurs procédés comme le moulinage, le lavage continu et la séparation par centrifugation [38]. La pharmacopée américaine (USP) spécifie que l'amidon utilisé pour des fins pharmaceutiques doit provenir du maïs, de la pomme de terre, du tapioca ou du blé tandis que la pharmacopée britannique (BP) permet aussi l'utilisation de l'amidon provenant du riz [24].

L'amidon est utilisé comme excipient principalement dans les formes pharmaceutiques orales où il est utilisé en tant que diluant et désintégrant [15]. L'amidon le plus fréquemment utilisé est l'amidon de maïs [17]. Ce polysaccharide ne présente pas d'incompatibilité avec les autres additifs. Par contre, il a le désavantage d'avoir un faible pouvoir de compression pour faire des comprimés suffisamment durs en augmentant la friabilité à hautes concentrations [17]. Il a aussi tendance à s'épandre après la compression. Il est plus utilisé pour la fabrication de capsules que pour la préparation de comprimés [17].

L'amidon est normalement très stable dans un environnement sec, mais instable lorsque préchauffé [15]. On peut citer en exemple les pâtes et les solutions d'amidon qui sont instables et facilement contaminées par les microorganismes [17]. Ces problèmes peuvent être plus sévères tout dépendant de la sorte d'amidon utilisé. En général, il doit être conservé dans des conditions hermétiques et dans un environnement sec et froid [15].

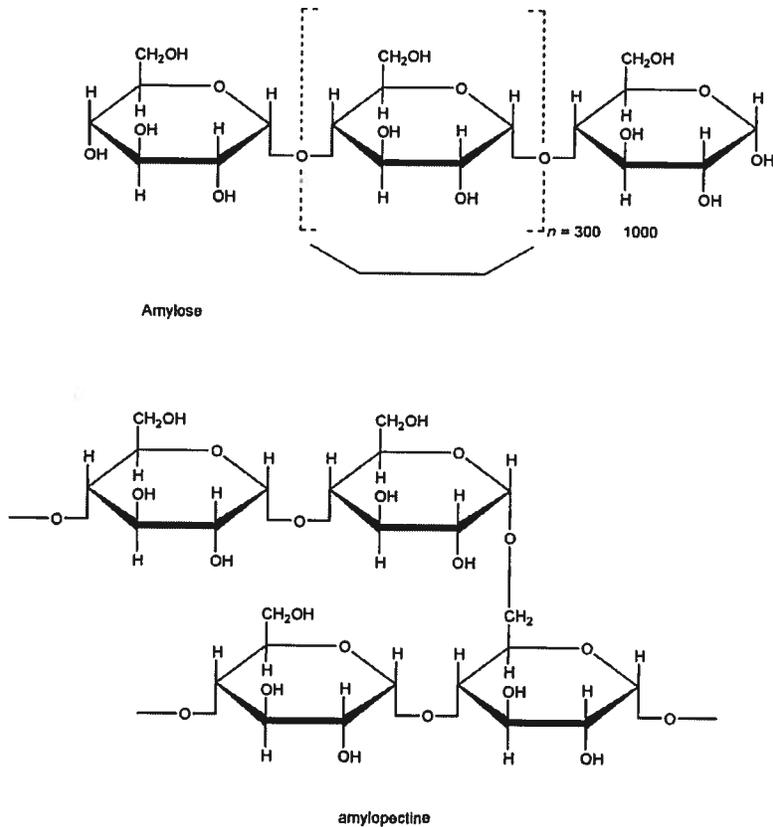


Figure 4. Représentation stéréochimique de l'amidon

1.4.1.5 La cellulose microcristalline

La cellulose microcristalline (figure 5) est une cellulose purifiée partiellement dépolymérisée de couleur blanche, sans odeur ni saveur [41]. Elle est fabriquée par l'hydrolyse contrôlée d' α -cellulose avec des solutions d'acides minéraux [15]. Après l'hydrolyse, l'hydrocellulose est purifiée par filtration et séchée par vaporisation [15]. Elle est reconnue comme produit non-toxique et non-irritant [42]. La consommation d'énormes quantités de cellulose peut provoquer un effet laxatif [16].

La cellulose microcristalline est couramment utilisée en industrie pharmaceutique comme diluant dans des comprimés et capsules fabriqués par granulation humide et par compression directe [17]. En plus, elle a des propriétés lubrifiantes et désintégrantes, ce qui la rend très utile pour la fabrication de comprimés [15]. Elle est disponible commercialement avec le nom de Avicel PH 101 et Avicel PH 102 [17].

L'Avicel utilisé à des concentrations de 5 – 15 % (p/p) permet de produire des comprimés caractérisés par une bonne dureté même si on utilise une faible force de compression [16]. Sa forte propriété d'agglutination est due à sa capacité de déformation plastique [42].

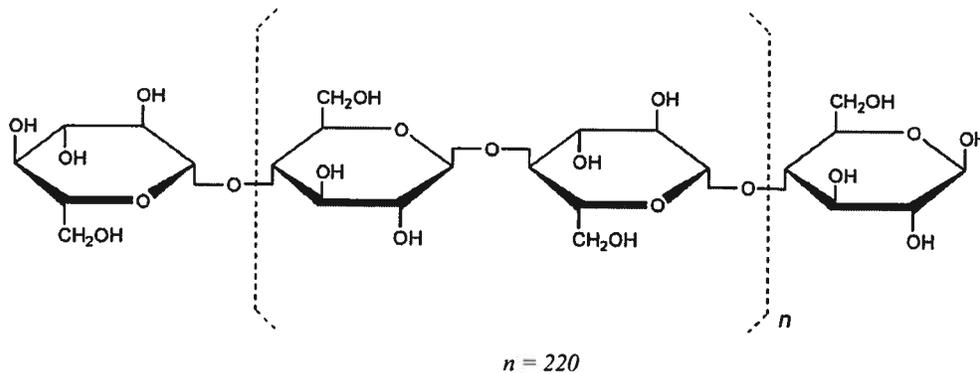


Figure 5. Représentation stéréochimique de la cellulose microcristalline

1.4.2 LES DÉSINTÉGRANTS

Les désintégrants sont des additifs ajoutés à la formulation pour accélérer la libération du principe actif dans les milieux digestifs pour en faciliter l'absorption par l'organisme [16,17]. Pour cela, il faut briser les forces de Van der Waals et les ponts hydrogène qui sont formés durant la compression [42].

Le gonflement a été considéré comme le principal mécanisme d'action de ce genre d'excipients [37,42]. Il permet la pénétration des liquides dans le comprimé en provoquant la séparation des granules et la dissolution du principe actif [37]. En général, les bons désintégrants sont insolubles et absorbent près de 20 % d'eau [42]. Par contre, les désintégrants solubles dans l'eau sont capables d'en absorber environ 40 %, augmentant ainsi le temps de désintégration [42].

Les excipients utilisés comme désintégrants sont classés en dérivés d'amidon (glycolate sodique d'amidon), en celluloses (carboxyméthyl cellulose), en alginates (alginates de sodium) et en gommes (gomme guar) [16,17].

1.4.2.1 Le glycolate sodique d'amidon

Le glycolate sodique d'amidon (figure 6) est un dérivé de l'amidon de pomme de terre [17]. Il est obtenu par l'ajout d'un groupe carboxyméthyl, suite à une réaction en milieu alcalin avec le chloreacétate de sodium, ce qui augmente ses propriétés hydrophiles, sans rendre le matériel complètement soluble [15]. Il se présente sous forme de poudre blanche, inodore et sans saveur dont la forme ressemble à de petits granules sphériques et ovales de 30 – 100 μm de diamètre [15].

Le glycolate sodique d'amidon est couramment utilisé comme désintégrant dans la fabrication de capsules et de comprimés préparés par granulation humide et compression directe [15]. Il est habituellement utilisé dans les formulations à une concentration de 2 – 8 % (p/p) avec une concentration optimale de 4 % (p/p) [15]. Celui-ci est un désintégrant qui agit rapidement et il n'est pas influencé par la force de compression [15]. De plus, même si l'efficacité de plusieurs désintégrants est affectée par la présence d'excipients hydrophobes, l'efficacité du glycolate sodique d'amidon ne l'est pas [15].

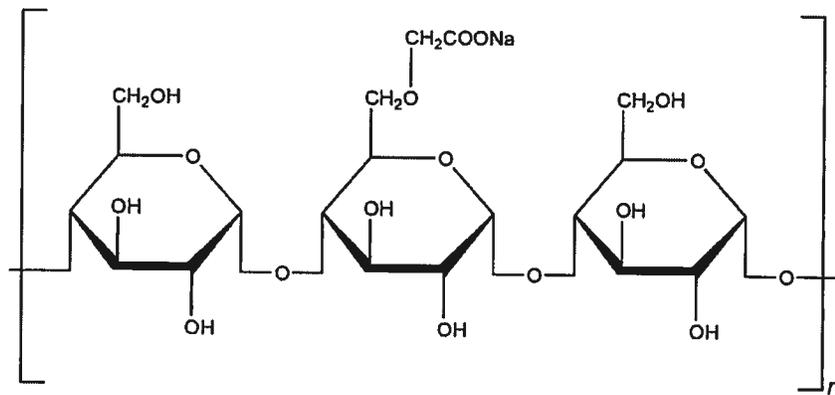


Figure 6. Représentation stéréochimique du glycolate sodique d'amidon

1.4.2.2 La croscarmellose sodique

La croscarmellose sodique (figure 7) est obtenue à la suite d'une réaction entre la cellulose alcaline et le monochloreacétate sodique pour obtenir la carboxyméthyl cellulose de sodium. Après que la réaction de substitution soit terminée, l'excès de monochloreacétate sodique s'hydrolyse lentement en acide glycolique. L'acide glycolique change quelques groupes de carboxyméthyl cellulose de sodium en acide libre et catalyse la formation de nouvelles liaisons que vont produire la croscarmellose sodique [15].

La croscarmellose sodique est utilisée comme désintégrant dans la formulation de capsules et comprimés préparés par granulation humide et compression directe [15]. Elle est efficace à faible dose (0,5 – 5,0 % p/p) et elle donne beaucoup de dureté aux comprimés [15]. La nature fibreuse de la croscarmellose sodique lui donne d'excellentes possibilités d'absorption et sa structure chimique réticulée rend un produit hydrophile insoluble avec de bonnes propriétés de gonflement [15].

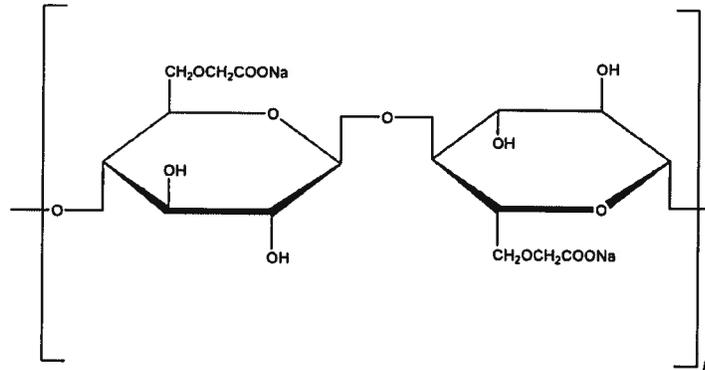


Figure 7. Représentation stéréochimique de la croscarmellose sodique

1.4.2.3 L'alginate de sodium

L'alginate sodique est un sel de sodium provenant de l'acide alginique [17]. Il est utilisé dans la formulation de plusieurs formes pharmaceutiques [15]. Dans la préparation de comprimés, l'alginate de sodium est utilisé comme désintégrant (5 – 10 % p/p) et comme diluant dans la fabrication de capsules [15,17]. L'alginate de sodium a aussi été utilisé dans la préparation de formulations orales à libération prolongée car il peut ralentir la dissolution des principes actifs [15].

Plus récemment, l'alginate de sodium a été utilisé pour la microencapsulation aqueuse de principes actifs ainsi que pour la formation de nanoparticules [10,15]. Il y a sur le marché plusieurs grades d'alginate de sodium avec différentes viscosités et il existe aussi différents dérivés et sels d'alginate dont l'alginate d'ammonium, l'alginate de calcium, l'alginate de magnésium et l'alginate de potassium chacun avec des propriétés différentes [15].

1.4.2.4 La gomme guar

La gomme guar est un polyglycoside extrait des gousses d'un arbuste, le *Cyamopsis tetragonolobus*, cultivé en Inde, au Pakistan et aux Etats-Unis. Elle est formée d'un enchaînement d'une unité galactose pour deux unités mannose [15]. La gomme guar est un galactomannane utilisé couramment dans les formulations cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques [15].

Dans l'industrie pharmaceutique, la gomme guar est utilisée comme désintégrant dans la fabrication de comprimés [17]. Elle est utilisée dans la préparation de comprimés matriciels à libération prolongée et à libération contrôlée en remplaçant les dérivés de cellulose [15]. La gomme guar est compatible avec la plupart des hydrocolloïdes mais elle est incompatible avec l'acétone, l'alcool, les tannins, les acides forts et les alcalis [15].

1.4.3 LES LUBRIFIANTS

La lubrification est un des aspects les plus complexes de la formulation de comprimés [43]. Les lubrifiants sont connus aussi sous le nom d'agents antifriction dont la principale fonction consiste à diminuer la friction parmi les particules pendant la compression en améliorant la transmission de la force de compression à la formulation [16,37]. La plupart des lubrifiants sont hydrophobes provoquant ainsi une augmentation du temps de désintégration et une diminution de la vitesse de dissolution [17,43].

Le choix du lubrifiant dépend de la voie d'administration, du genre de comprimé à produire, des profils de dissolution et de désintégration désirés, de la compatibilité avec le principe actif et du prix [17]. Les lubrifiants les plus connus sont le stéarate de magnésium, le talc, le stéarate de calcium, l'acide stéarique et l'huile végétale hydrogénée [16]. La plupart des lubrifiants, à l'exception du talc, sont utilisés à des concentrations inférieures à 1 % [43].

1.4.3.1 Le stéarate de magnésium

Le stéarate de magnésium est une poudre fine, blanche, impalpable de basse densité ayant la formule chimique suivante: $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}]_2\text{Mg}$ [17]. La poudre présente une texture huileuse et elle adhère à la peau facilement [15]. Le stéarate de magnésium est le lubrifiant le plus efficace et le plus utilisé dans les formulations cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques [43]. Il est utilisé comme lubrifiant dans la fabrication de capsules et comprimés à concentrations environnant les 0,25 – 5,0 % p/p [15]. Ce produit est hydrophobe et il peut ralentir la dissolution de formes orales [17]. Il est incompatible avec des acides forts, des alcalis et des sels de fer. Il ne peut pas être utilisé dans des produits contenant de l'aspirine, certaines vitamines et des alcaloïdes [15].

1.4.3.2 Le talc

Le talc est un silicate de magnésium purifié ayant la formule chimique suivante: $\text{Mg}_6(\text{Si}_2\text{O}_5)_4(\text{OH})_4$ [15]. Il peut contenir une faible quantité de silicate d'aluminium et de fer [43]. Le talc a été utilisé couramment comme lubrifiant et diluant dans les formes orales à concentrations de 5 % (p/p) mais, en raison de son potentiel carcinogène, son utilisation a diminué considérablement [15,16]. Il est toutefois encore utilisé comme retardant de dissolution dans le développement de comprimés à libération contrôlée [15].

1.4.3.3 L'huile végétale hydrogénée

L'huile végétale hydrogénée est un mélange de triglycérides d'acides gras sous forme de poudre fine ou de flocons [15]. La couleur du produit dépend du procédé de fabrication et de la forme. En général, le matériel est blanc ou jaune - blanc [15].

L'huile végétale est utilisée comme lubrifiant dans la formulation de capsules et comprimés à concentration de 1 – 6 % (p/p) en combinaison avec du talc [15]. Elle est utilisée aussi pour la formation de matrices dans les formulations lipophiles à libération contrôlée [15].

1.4.4 LES AGGLUTINANTS

Les agglutinants sont des excipients qui fusionnent les particules (action cohésive) lorsque la force de pression n'est pas suffisante pour les maintenir regroupées en granules [16,17]. En plus, ils augmentent la résistance des comprimés à l'écrasement tout en réduisant la vitesse de dissolution [37]. Ils peuvent être utilisés sous la forme sèche mais en général, il sont incorporés en solution à la formulation pour assurer une distribution homogène [16]. L'utilisation d'un agglutinant trop puissant ou d'un agglutinant en grande quantité produira des comprimés difficiles à désintégrer [17].

Le principal critère pour choisir les agglutinants est la compatibilité avec les autres ingrédients de la formulation [17]. Parmi les agglutinants naturels, on retrouve la gomme arabique (acacia) et la gélatine. Certains dérivés de la cellulose comme la méthyl cellulose, la carboxyméthyl cellulose sodique, l'éthylcellulose sont aussi utilisés en industrie mais en moindre quantité [18].

1.4.4.1 La gomme arabique (acacia)

La gomme arabique connue aussi comme acacia, est un polysaccharide complexe constitué de sucres et d'hémicellulose avec un poids moléculaire approximatif de 240,000 – 580,000 daltons contenant quelques sels complexés (calcium, potassium, magnésium) [15].

L'acacia est utilisée principalement dans des formes pharmaceutiques orales comme agent émulsifiant [15]. Elle est aussi employée comme agglutinant pour préparer des comprimés à concentration de 10 – 25 %, elle peut produire des comprimés de dureté modérée [17].

1.4.4.2 La gélatine

La gélatine est le terme générique pour décrire le mélange de protéines obtenues suite à l'hydrolyse acide ou alcaline du collagène animal. Les fractions protéiques ont un poids moléculaire entre 15, 000 – 25, 000 daltons [15].

La gélatine est couramment utilisée dans plusieurs formes pharmaceutiques, spécialement pour la production de capsules [15]. Dans la fabrication de comprimés, la gélatine qui est plus facile à manipuler que l'acacia, peut produire des comprimés de bonne dureté et augmenter le temps de dissolution et de désintégration [17]. La gélatine est aussi utilisée pour la microencapsulation des principes actifs comme les huiles de poisson et les vitamines lipophiles [10].

1.5 LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE

1.5.1 LA PRODUCTION DE LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE

Des travaux antérieurs ont montré qu'il était possible d'obtenir une matrice appelée MPM (Matrice Protéique Malléable) suite à la fermentation du lactosérum par une souche pure de *Lactobacillus kefiranofaciens* [3]. Au cours de la croissance, la bactérie sécrète dans le milieu des exopolysaccharides (EPS) et des protéases endogènes. Les protéases s'attaquent aux protéines de lactosérum pour générer des peptides variant en longueur et en hydrophobicité. Les EPS, quant à eux, interviennent dans l'agglomération de ces mêmes peptides. La MPM est finalement récupérée par l'ajout de chlorure de calcium et par l'ajustement du pH. Les conditions physico-chimiques choisies favorisent l'agglomération des peptides, des EPS et des bactéries, ce qui forme une matrice composée à 85% d'eau [3].

Les constituants de la MPM (protéines et peptides de lactosérum, exopolysaccharides bactériens, bactéries lactiques et calcium) sont tous reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Ce produit a un fort potentiel nutraceutique et de stimulation du système immunitaire [4,5,6]. La MPM qui a reçu l'approbation de Santé Canada comme produit domestique à consommation non restreinte, appartient à une nouvelle gamme de produits destinée à la formulation d'aliments fonctionnels [44].

1.5.2 LES PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES ET DES PEPTIDES DE LACTOSÉRUM

Le lactosérum est un liquide riche en protéines dérivé de la fabrication du fromage [45]. Les protéines du lactosérum, se retrouvent sous forme de solution colloïdale et représentent environ 20 % des protéines totales [45]. Les deux principales sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, précurseurs d'acides aminés essentiels [46]. D'autres protéines comme les immunoglobulines, l'albumine bovine et la lactoferrine sont aussi présentes [45,47].

Des études récentes font la lumière sur les principaux effets biologiques des protéines isolées du lactosérum dont la stimulation du système immunitaire [48,49], la protection de la muqueuse intestinale [50], les propriétés anticancéreuses [51] et les propriétés antimicrobiennes [52,53,54]. Le potentiel immunomodulateur des protéines de lactosérum est un domaine de recherche en croissance en raison de l'énorme intérêt des consommateurs pour les aliments fonctionnels et les allergies aux produits laitiers [48].

La β -lactoglobuline, la protéine majeure du lactosérum, représente 55% des protéines totales [45]. La structure tertiaire de cette protéine montre une petite partie hydrophobe permettant ainsi de fixer des acides gras et la vitamine A [40]. Des expériences chez des rongeurs indiquent que la β -lactoglobuline favorise la prolifération de cellules immunitaires (lymphocytes) et inhibe le développement de tumeurs [48,49,51]. En guise d'exemple, la β -lactoglobuline après une digestion enzymatique génère des peptides avec les attributs suivants: peptides augmentant la perméabilité intestinale, peptides ayant des effets sur la

baisse du cholestérol circulant et peptides qui jouent un rôle dans le contrôle de la pression artérielle [49,55,56].

L' α -lactalbumine qui représente 22 % des protéines du lactosérum est une métalloprotéine qui possède une portion hydrophobe jouant un rôle dans la biosynthèse du lactose [40]. Il a été démontré que l' α -lactalbumine et ses peptides ont des propriétés bactéricides et ils induisent le processus d'apoptose chez des cellules précancéreuses [50,51].

Les immunoglobulines constituent 13 % des protéines du lactosérum [45]. Les immunoglobulines offrent une protection antimicrobienne et confèrent aussi une immunité passive [54]. Des études cliniques démontrent l'efficacité de ce genre de protéines pour la prévention et traitement de plusieurs infections en incluant celles causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques [54].

L'albumine bovine, représente pour sa part 7 % des protéines du lactosérum [45]. Elle est reliée au transport de différentes substances comme des hormones et des acides gras insolubles qui lui confèrent une résistance à la dénaturation thermique [47].

La lactoferrine qui représente 4 % des protéines du lactosérum est la seule protéine du lactosérum porteuse de fer et capable d'être stable en présence d'ions ferriques [40]. En limitant la disponibilité du fer dans l'environnement, la lactoferrine agit comme agent antimicrobien [52,53]. Elle fut identifiée comme étant responsable du maintien de l'activité phagocytaire des macrophages qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans le processus d'immunité de la muqueuse (production d'IL-18) [52,53].

1.5.3 LES PROPRIÉTÉS DES LACTOBACILLES

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques retrouvées dans des habitats très variés [57]. Ils font entre autre partie de la flore normale du corps humain au niveau du système digestif [40]. Le genre *Lactobacillus* est le genre le plus hétérogène des bactéries lactiques. Il englobe un large spectre de phénotypes et exhibe plusieurs propriétés physiologiques différentes [39,58].

L'industrie alimentaire utilise couramment des lactobacilles pour la production d'aliments fermentés [39,40]. Maintenant des cultures probiotiques sont ajoutées aux produits fermentés en rapport à leurs effets bénéfiques sur la santé [44]. Les probiotiques peuvent être définis comme des suppléments microbiens (principalement de bactéries lactiques) ayant des effets bénéfiques sur l'hôte dont la flore microbienne intestinale est améliorée [59].

Les effets bénéfiques des lactobacilles probiotiques sont : la stabilisation de la microflore intestinale, l'augmentation de la résistance aux bactéries pathogènes, la stimulation du système immunitaire, l'effet anti-tumoral, la diminution des diarrhées, la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose et la réduction de la concentration de cholestérol sanguin [59,60].

Le genre de lactobacille utilisé pour la production de la MPM est une souche pure de *Lactobacillus kefiranofaciens* [3]. Elle a été isolée de grains de kéfir et adaptée pour croître dans le lactosérum [3,44]. Cette souche à fort potentiel probiotique fait partie de l'appellation de bactéries acido-lactiques [61,62].

De nombreuses études ont démontré que les lactobacilles (*Lactobacillus kefiranofaciens*) produisant les EPS et ceux contenus dans la MPM, ont des propriétés qui peuvent être bénéfiques pour la santé [6,63,64]. Il est reconnu que certains de ces lactobacilles peuvent avoir un effet direct sur le système immunitaire et ils peuvent modifier

l'absorption intestinale sans nécessairement s'y implanter [65,66]. Cela suggère que la MPM (contenant une importante quantité de lactobacilles) peut diminuer les troubles intestinaux grâce au potentiel probiotique de la souche.

1.5.4 LES PROPRIÉTÉS DES EXOPOLYSACCHARIDES (EPS)

Les microorganismes dans les différentes niches écologiques rivalisent continuellement pour leur survie [57]. Dans des conditions défavorables, plusieurs espèces de lactobacilles produisent des exopolysaccharides, qui les protègent de l'environnement adverse et des bactériophages et protozoaires [67]. Les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries lactiques sont utilisés particulièrement dans l'industrie alimentaire afin d'apporter une texture satisfaisante et une stabilité suffisante aux produits principalement en modifiant ses propriétés rhéologiques [40,68].

Les bactéries lactiques, comme plusieurs autres bactéries, produisent une grande variété d'exopolysaccharides [39,68]. Ceux-ci sont généralement produits par diverses conditions de culture et ils ne semblent pas être dégradés par les organismes producteurs. Les quantités produites sont influencées par les conditions de fermentation et la composition du milieu de culture.

Il a été démontré que les EPS produits par *Lactobacillus kefiranofaciens* ont des propriétés bénéfiques sur la santé comme la stimulation du système immunitaire par la prolifération de lymphocytes des plaques de Peyer [69,70]. Des expériences chez des rongeurs indiquent que les EPS de *L.kefiranofaciens* ont une activité antitumorale [64,67,71,72]. En plus, ils ont le potentiel de diminuer le niveau de cholestérol sanguin [64].

Les EPS contenus dans la MPM peuvent également avoir des propriétés servant à l'encapsulation de médicaments [10]. En effet, la littérature révèle que les formulations à base de polysaccharides servent à transporter plusieurs types de médicaments [73]. Les EPS ont donc le potentiel de faciliter le transport oral des principes actifs en tant que diluants et agglutinants en plus d'offrir la possibilité de modifier la réponse biologique grâce à leurs propriétés nutraceutiques.

1.5.5 LA MPM EN TANT QU'EXCIPIENT

Comme mentionné auparavant, la MPM renferme des éléments favorables à l'immunomodulation [48,49]. Parmi ceux-ci, on retrouve des protéines de lactosérum, des bactéries lactiques, des vitamines, des minéraux et aussi de nombreux peptides (reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes) issus de l'hydrolyse des protéines lors de la fermentation. La MPM contient aussi des bactéries lactiques pouvant conférer des bienfaits sur la santé au niveau intestinal et de la stimulation du système immunitaire [65,66]. En plus de l'effet biologique bénéfique de la présence des composants mentionnés ci-haut, la formulation initiale de la MPM en fait un transporteur pharmaceutique intéressant. En tant que diluant et agglutinant, elle permet l'incorporation de molécules tant hydrophobes qu'hydrophiles, une stratégie communément recherchée dans l'industrie pharmaceutique pour améliorer la solubilité de principes actifs [74].

Les stratégies suggérées de nos jours pour augmenter la biodisponibilité orale visent toutes à modifier uniquement les propriétés physico-chimiques des formulations orales sans pour autant tenter d'influencer la réponse biologique face au médicament [16,17]. L'avantage que présente la MPM, grâce à ses propriétés biologiques, a fortement stimulé le développement d'un nouvel axe de technologie pharmaceutique, soit la MPM en tant qu'excipient.

En se basant sur les propriétés de la β -lactoglobuline, de l'albumine bovine et des exopolysaccharides pour fixer et transporter des molécules hydrophiles et hydrophobes [40,47, 73] ainsi qu'en considérant que le lactose est l'excipient le plus utilisé dans l'industrie pharmaceutique [15,17], on a établie comme hypothèse que la MPM (constituée par les composés mentionnés ci-haut) peut être utilisée pour la formulation des principes actifs de haute valeur commerciale en tant qu'excipient pharmaceutique (diluant et agglutinant). Pour vérifier cette hypothèse, on s'est fixé les objectifs suivants: l'élaboration des diverses formulations de comprimés à base de MPM avec et sans acétaminophène comme traceur hydrophile, l'évaluation de ces comprimés selon les méthodes standards de l'industrie pharmaceutique (USP), dont les propriétés rhéologiques de la MPM, la caractérisation des propriétés physiques de comprimés, la forme des particules des formulations, la dissolution des comprimés ainsi que la stabilité des formulations.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA MPM EN TANT QU'EXCIPIENT

Pour cette étude, trois lots différents de MPM lyophilisés (en vrac) ont été utilisés (PC 008, PC 009 et PC 010). En raison de la taille hétérogène des particules des trois lots de MPM, on a trituré d'autres échantillons à l'aide du mortier afin d'en uniformiser la taille (MPM triturée). Donc, les expériences suivantes ont été faites sur les MPM «triturés» et «en vrac» donnant 6 lots différents de MPM à évaluer.

Après avoir évalué les caractéristiques rhéologiques de la poudre, les MPM ont été comprimés dans une presse de type industrielle. Les comprimés produits ont été testés selon les paramètres suivants; masse (g), épaisseur (mm), dureté (KN), friabilité (% de poids perdu) et désintégration. Ces paramètres représentent les caractéristiques de base à évaluer lors de la fabrication de lots cliniques [25].

2.1.1 RHÉOLOGIE DE LA MPM LYOPHILISÉE

La méthodologie suivante a permis d'analyser les propriétés d'écoulement de différents lots de MPM à la lumière de l'indice de Carr (IC). L'indice de Carr est une valeur dérivée des densités de masse et compactée, qui aide à interpréter les propriétés rhéologiques des matériaux [23]. L'équipement utilisé pour cette expérience est illustré dans la figure 8.

Pour chaque lot de MPM analysé, un cylindre gradué a été rempli avec un échantillon de poids connu (M) et le volume initial (V_0) a été mesuré. La densité initiale est déterminée par la formule suivante: ρ_0 (M/ V_0) [23,24]. Après 100 tapes dans le *Vander Kamp Tap density* le volume de la poudre (V_1) a été mesuré. La densité compactée est déterminée par la formule suivante: ρ_1 (M/ V_1). Les résultats sont exprimés en termes de volume compressible ($V_0 - V_1$) et reporté en cm^3 par gramme. Les indices de Carr ont été obtenus par la formule suivante [23,34]:

$$IC (\%) = \frac{\rho_1 - \rho_0}{\rho_1} \times 100$$

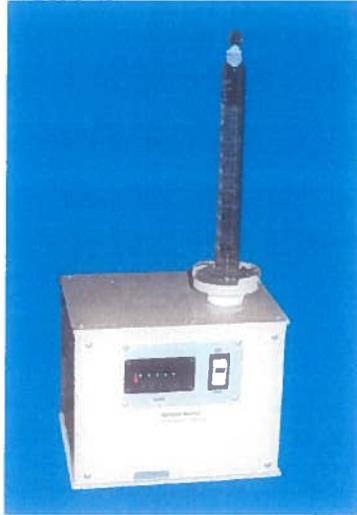


Figure 8. Vander Kamp Tap density tester

2.1.2 PRODUCTION INDUSTRIELLE DES COMPRIMÉS DE MPM

La préparation des comprimés de MPM avec une presse de type industriel (presse *Manesty Single Punch F3*), illustrée dans la figure 9, a été faite afin de mimer de façon plus adéquate les conditions de compression industrielle. Les caractéristiques des comprimés et de la presse peuvent être consultées dans le tableau III ci-dessous.



Figure 9. Presse Manesty Single Punch F3

Tableau III : Caractéristiques de la presse *Manesty F3* et des comprimés

Presse	Manesty single punch F3
Vitesse de compression	85 comprimés/heure
Temps de compression (dwell time)	118 millisecondes
Diamètre et forme des comprimés	8 mm, rond et biconvexe
Masse des comprimés	Ciblée à 200 milligrammes

Les formulations ont été comprimées dans la presse de type industriel jusqu'à la formation de comprimés solides de 200 mg. Le stéarate de magnésium (lubrifiant) a été incorporé à une concentration de 0,5 % (p/p) dans les trois lots de MPM triturées pour éviter des problèmes de collage lors de la compression. Il est important de signaler que la presse Manesty n'est pas informatisée. Il a donc été impossible de déterminer la force de compression appliquée aux MPM.

2.1.3 ÉVALUATION DU POIDS ET DE L'ÉPAISSEUR DES COMPRIMÉS DE MPM

La méthodologie suivie pour vérifier l'uniformité du poids des comprimés, s'adapte des exigences de l'USP selon la systématique suivante : 10 comprimés de chaque lot de MPM sont pesés individuellement et la masse moyenne est déterminée [24]. Pour évaluer l'uniformité de l'épaisseur des comprimés, l'épaisseur de six comprimés choisis de façon aléatoire a été mesurée individuellement pour calculer ensuite l'épaisseur moyenne [24].

2.1.4 ÉVALUATION DE LA DURETÉ ET DE LA FRIABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM

La dureté des lots de comprimés à étudier dans ce travail a été déterminée avec l'appareil *Pharma test type PTB 301*, présenté dans la figure 10. En accord avec la pharmacopée américaine, la dureté de six comprimés a été déterminée pour chaque lot étudié [24].

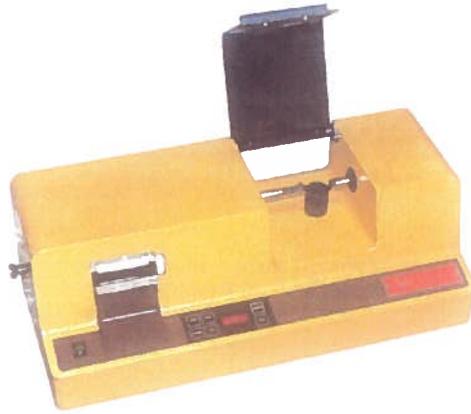


Figure 10. *Pharma test type PTB 301*

Pour ce qui est du test de friabilité, toujours selon les indications de la pharmacopée américaine, un échantillon de 6,5 g de comprimés pour chaque lot à tester a été utilisé. Les comprimés ont été placés dans le tambour du *VanKel friabilator*, illustré dans la figure 11. Après 100 révolutions, on a évalué la perte de poids et on a calculé le pourcentage de poids perdu.



Figure 11. *VanKel Friabilator*

2.1.5 ÉVALUATION DE LA DÉSINTÉGRATION DES COMPRIMÉS DE MPM

Les comprimés des lots à étudier ont été placés dans l'appareil de désintégration *Vander Kamp Desintegration tester* (figure 12), en présence d'eau distillée à 37 °C selon les indications de la pharmacopée américaine [24]. Une observation visuelle a été réalisée après 30 minutes en accord à l'USP et après 4 heures.



Figure 12. *Vander Kamp Disintegration tester*

2.2 ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM

Une étude de stabilité sur une période de deux mois a été effectuée sur les lots de comprimés de MPM utilisés pour les expériences décrites dans le sous chapitre 2.3 afin d'évaluer leur stabilité [32,33]. Les comprimés de chaque lot de MPM à étudier ont été placés sous trois conditions de température différentes (25 °C, 40 °C et 60 °C) dans des étuves. Après deux mois, les comprimés ont été évalués selon les paramètres suivants : masse (g), épaisseur (mm), dureté (KN) et friabilité (% de masse perdue) pour déterminer si des changements significatifs sont observés. Des analyses statistiques (ANOVA et test de Tuckey) ont été réalisées à l'aide du service de biostatistique de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour évaluer la différence entre les lots des comprimés de MPM.

2.3 ÉVALUATION VISUELLE DE LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE

2.3.1 ÉVALUATION DE LA FORME DES PARTICULES DE LA MPM

La méthodologie décrite ci-dessous a été suivie afin de déterminer la forme des particules de la MPM humide et sèche (lyophilisée). Elle a permis aussi d'évaluer si l'ajout d'additifs peut induire un changement de la taille et de la forme des particules de MPM [2].

Pour évaluer la forme des particules de la MPM humide, une dilution à 1% (p/v) de MPM humide dans l'eau distillé a été réalisée. Une partie aliquote de 1 mL a été prélevée de la solution précédente à laquelle on a ajouté 5 μ L de Sypro Orange (Molecular Probes, Inc.) pour mettre en évidence les protéines. Une gouttelette a été prise et observée en microscopie à fluorescence (100x) avec le filtre de 450-490 nm.

La forme des particules de la MPM lyophilisée a été évaluée avec un échantillon de MPM lyophilisée et reconstituée préalablement. La méthodologie suivie pour l'observation du réseau protéique est telle que décrite dans le paragraphe précédent.

Pour évaluer l'effet de l'ajout d'EPS sur la forme des particules de la MPM, des EPS (fournis par les membres de l'équipe du Pr. Dupont) ont été incorporés dans la MPM humide à une concentration de 0,6 % (p/p). Le mélange de MPM-EPS a été lyophilisé et reconstitué. Encore une fois, le protocole décrit ci-dessous pour la coloration et observation des protéines a été suivi.

2.3.2 VIABILITÉ DES BACTÉRIES DANS LA MPM

Le colorant BacLight (Molecular Probes Inc.) est une trousse commerciale qui permet de colorer simultanément les bactéries vivantes (verte) et les bactéries mortes (rouge) selon la perméabilité de leur membrane plasmique [75]. On se sert de cette propriété pour observer par microscopie la survie des bactéries dans la MPM.

Pour évaluer la forme des particules et la viabilité des lactobacilles dans la MPM humide, une dilution à 1% (p/v) de MPM humide dans l'eau distillé a été réalisée. Une partie aliquote de 1 mL a été prélevée de la solution précédente pour ensuite lui ajouter 3 μ L de BacLight. Une gouttelette a été prise pour l'observer au microscope de fluorescence (100x) avec le filtre de 450-490 nm.

La forme de particules de la MPM lyophilisée ainsi que l'effet de la lyophilisation sur la viabilité des lactobacilles ont été évalués avec un échantillon de MPM lyophilisée et reconstituée préalablement en utilisant la méthodologie de coloration décrite dans le paragraphe précédent. Cette méthodologie de coloration a été aussi utilisée pour évaluer l'effet de l'ajout d'EPS sur la forme des particules de la MPM et la viabilité des lactobacilles. Les EPS (fournis par les membres de l'équipe du Pr. Dupont) ont été incorporés dans la MPM humide à une concentration de 0,6 % (p/p). Le mélange de MPM-EPS a été lyophilisé et reconstitué pour être ensuite observé au microscope.

2.4 ÉTUDE CINÉTIQUE *IN VITRO* DE LA LIBÉRATION D'AGENTS THÉRAPEUTIQUES

2.4.1 RÉALISATION DES COMPRIMÉS À BASE DE MPM

L'acétaminophène (Sigma Chem. Co.) a été mélangé à diverses concentrations avec la MPM additionnée ou non d'EPS pour préparer des comprimés. Les comprimés possédant une masse de 500 mg ont été obtenus suite à une compression de 5 secondes à 72,900 psi à température pièce dans une presse hydraulique Carver présentée dans la figure 13.



Figure 13. Presse Carver

Le tableau IV présente la composition des différentes formulations de comprimés de MPM préparés. Dans le cas des formulations A, B et C, l'acétaminophène a été mélangé de façon homogène avec la MPM pour fabriquer des comprimés par la méthode de compression directe. Pour ce qui est des autres formulations (D à P) les comprimés ont été préparés par la méthode de granulation humide. Des solutions homogènes d'EPS et d'acétaminophène ont été mélangées avec de la MPM humide. Les mélanges ont été lyophilisés et tamisés. Finalement, les formulations ont été placées dans la presse pour fabriquer des comprimés.

Tableau IV : Formulations des comprimés à base de MPM

Formulation	Lot MPM	MPM (forme)	MPM % (p/p)	Acetamin. % (p/p)	Lot EPS utilisé	EPS % (p/p)
A	F – 078	Sèche	95 %	5 %	-	-
B	F – 078	Sèche	90 %	10 %	-	-
C	F – 078	Sèche	80 %	20 %	-	-
D	PC 007.2	Humide	95 %	5 %	-	-
E	PC 007.2	Humide	90 %	10 %	-	-
F	PC 007.2	Humide	80 %	20 %	-	-
H	PC 007.2	Humide	89,8 %	10 %	ABE - 1	0,2 %
I	PC 007.2	Humide	89,4 %	10 %	ABE - 1	0,6 %
J	PC 007.2	Humide	89 %	10 %	ABE - 1	1,0 %
G	PC 010	Humide	90 %	10 %	-	-
K	PC 010	Humide	89 %	10 %	NBE 4	1,0 %
M	PC 010	Humide	80 %	10 %	NBE 4	10,0 %
N	PC 010	Humide	70 %	10 %	NBE 4	20,0 %
L	PC 010	Humide	89 %	10 %	ABE - 3	1,0 %
O	PC 010	Humide	80 %	10 %	ABE - 3	10,0 %
P	PC 010	Humide	70 %	10 %	ABE - 3	20,0 %

2.4.2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS GASTRIQUES ET INTESTINALES

Deux solutions ont été utilisées pour les expériences de dissolution *in vitro*. Elles ont été préparées selon la méthode suggérée par la USP XXV (*United States Pharmacopeia*) [24]. La SGF (simulation de sucs gastriques) a été préparée avec de la pepsine (3,2 g/L) et du NaCl (2,0 g/L). La température de la solution est toujours contrôlée à 37 °C et le pH à 1,5. La SIF (simulation de sucs intestinaux) a été préparée avec de la pancréatine (10 g/L), de la bile (1,5 g/L) et du KH_2PO_4 (6,8 g/L) comme tampon. La température de la solution est toujours contrôlée à 37 °C et le pH à 8,0.

2.4.3 CINÉTIQUE DE DISSOLUTION ET DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ACÉTAMINOPHÈNE

2.4.3.1 Cinétique de dissolution des comprimés dans la solution gastrique (SGF)

Les comprimés du tableau III ont été placés individuellement dans un petit panier métallique dans 500 mL de SGF à 37°C dans un fermenteur en imitant l'appareil à dissolution USP à une agitation contrôlée de 100 rpm. Le prélèvement des échantillons (10mL) a été réalisé aux temps 5, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes. La libération d'acétaminophène a été suivie à 250 nm par spectrophotométrie UV. Chaque expérience a été faite en triplicata. La figure 9 montre une photo de l'appareil à dissolution utilisé.

2.4.3.2 Cinétique de dissolution des comprimés dans la solution intestinale (SIF)

Pour cette expérience on a utilisé la même méthodologie décrite précédemment. Les seules variantes ont été le milieu de dissolution (SIF) et le nombre d'échantillons prélevés (8) réalisé aux temps 5, 15, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes.

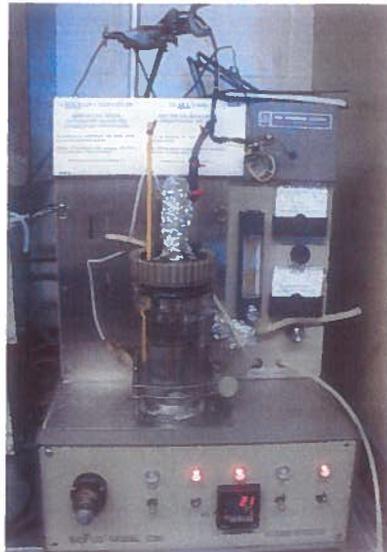


Figure 14. Fermenteur BioFlo C30

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA MPM EN TANT QU'EXCIPIENT

Une caractérisation galénique des MPM a été réalisée afin de comprendre les mécanismes impliqués lors de la fabrication de comprimés. Certaines propriétés rhéologiques ainsi que des paramètres physiques des comprimés de MPM lyophilisées (en vrac et triturées) ont été déterminés.

3.1.1 RHÉOLOGIE DE LA MPM LYOPHILISÉE

L'indice de Carr (IC) de chaque lot de MPM à étudier a été calculé à partir de la densité initiale (ρ_0) et de la densité compactée (ρ_1) des poudres. Les résultats sont exprimés en termes de volumes compressibles ($V_0 - V_1$) et reportés en cm^3 par gramme. Le tableau V résume les résultats de ces expériences.

Tableau V : Caractéristiques rhéologiques des lots de MPM

	PC 008 en vrac	PC 009 en vrac	PC 010 en vrac	PC 008 Triturée	PC 009 triturée	PC 010 triturée
ρ_0 (g/cm^3)	0,31	0,38	0,39	0,49	0,5	0,58
ρ_1 (g/cm^3)	0,38	0,44	0,45	0,62	0,6	0,64
IC	17,35	14,13	14,0	21,48	16,11	9,76

3.1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DES COMPRIMÉS DE MPM

Des comprimés de MPM en vrac et triturées ont été fabriqués à l'aide d'une presse Manesty single punch F3 pour bien imiter les conditions de production industrielle de comprimés. Les comprimés produits ont été testés selon les paramètres suivants: masse (g), épaisseur (mm), dureté (KN), friabilité (% de masse perdue) et désintégration. Les résultats obtenus peuvent être consultés dans le tableau VI.

Tableau VI : Caractéristiques physiques des comprimés de MPM

	PC 008 en vrac	PC 009 en vrac	PC 010 en vrac	PC 008 triturée	PC 009 triturée	PC 010 triturée
Poids (n = 10) (g±SD)	0,1967 ± 0,05	0,2302 ± 0,061	0,2537 ± 0,0053	0,2081 ± 0,0022	0,2079 ± 0,0076	0,2283 ± 0,0049
Épaisseur (n = 6) (mm±SD)	3,92 ± 0,19	4,18 ± 0,15	4,53 ± 0,05	3,92 ± 0,19	4,0 ± 0,0	4,1 ± 0,0
Dureté (n=6) (KN±SD)	19,9 ± 1,0	20,2 ± 1,9	19,0 ± 1,0	17,0 ± 0,05	13,5 ± 0,6	8,9 ± 0,3
Friabilité (%)	0,05	0,003	0,03	0,07	0,11	0,10
Désintég. (n=6)	Gonflement faible	Gonflement	Gonflement et explosion	Gonflement faible	Gonflement	Gonflement et explosion

3.2 ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM

Les études de stabilité permettent de vérifier si les comprimés conservent leurs propriétés physico-chimiques en fonction de l'exposition à différentes conditions dans un intervalle de temps défini [31]. Ainsi, les comprimés de MPM produits par la presse de type industrielle ont été placés à différentes températures (25 °C, 40 °C et 60 °C) pendant 2 mois afin d'évaluer les changements des paramètres physiques déterminés dans le sous chapitre précédent. Le tableau VII ci-après résume les résultats de la stabilité des comprimés.

Tableau VII : Stabilité des comprimés de MPM

Lots de MPM	PC 008							
	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C
	en vrac	en vrac	en vrac	en vrac	trit.	trit.	trit.	trit.
Poids (n = 10) (g±SD)	0,1967 ± 0,05	0,2151 ± 0,0068	0,2035 ± 0,0113	0,1971 ± 0,0171	0,2081 ± 0,0022	0,2252 ± 0,011	0,2065 ± 0,0053	0,2051 ± 0,0052
Épaisseur (n=6) (mm ± SD)	3,92 ± 0,19	4,03 ± 0,07	3,93 ± 0,07	3,91 ± 0,05	3,92 ± 0,19	4,22 ± 0,02	3,85 ± 0,38	3,98 ± 0,13
Dureté (n=6) (KN ± SD)	19,9 ± 1,0	11,0 + 0,9	15,7 + 1,2	16,6 + 1,0	17,0 ± 0,5	9,0 ± 0,3	13,0 ± 1,0	13,7 ± 1,2
Friabilité (%)	0,05	0,07	-0,04	-0,11	0,07	0,09	-0,04	-0,09

Lots de MPM	PC 009							
	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C
	en vrac	en vrac	en vrac	en vrac	trit.	trit.	trit.	trit.
Poids (n = 10) (g±SD)	0,2302 ± 0,061	0,2562 ± 0,006	0,2364 ± 0,0062	0,2358 ± 0,0103	0,2079 ± 0,0076	0,2283 ± 0,0072	0,2133 ± 0,0081	0,2138 ± 0,012
Épaisseur (n=6) (mm ± SD)	4,18 ± 0,15	4,60 ± 0,09	4,46 ± 0,05	4,44 ± 0,07	4,00 ± 0,00	4,25 ± 0,06	4,25 ± 0,07	4,13 ± 0,07
Dureté (n=6) (KN ± SD)	20,2 ± 1,9	10,0 ± 0,8	17,1 ± 0,7	16,7 ± 1,2	13,5 ± 0,6	7,1 ± 0,8	11,1 ± 0,9	10,9 ± 0,1
Friabilité (%)	0,03	0,04	-0,08	-0,10	0,11	0,11	-0,22	-0,19

Lots de MPM	PC 010							
	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C	Temps 0	2 mois-25°C	2 mois-40°C	2 mois-60°C
	en vrac	en vrac	en vrac	en vrac	trit.	trit.	trit.	trit.
Poids (n = 10) (g±SD)	0,2537 ± 0,0053	0,2682 ± 0,0124	0,2565 ± 0,0086	0,2517 ± 0,0097	0,2283 ± 0,0049	0,2476 ± 0,0103	0,2303 ± 0,0078	0,2289 ± 0,0089
Épaisseur (n=6) (mm ± SD)	4,53± 0,05	4,87 ± 0,21	4,61 ± 0,10	4,69 ± 0,11	4,1 ± 0,00	4,37 ± 0,02	4,37 ± 0,06	4,52 + 0,03
Dureté (n=6) (KN ± SD)	19,0 ±1,0	10,5 ± 1,2	15,7 ± 0,9	16,3 ± 0,8	8,9 ± 0,3	5,1 ± 0,3	7,3 ± 0,7	7,4 ± 0,4
Friabilité (%)	0,03	0,22	0,10	0,07	0,10	0	-0,07	-0,13

Pour évaluer la différence entre les lots, des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du service de biostatistique de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Comme première évaluation, l'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour déterminer s'il y avait des différences entre les trois températures. Suite à des différences significatives obtenues, on a poursuivi avec un test de Tukey (test posteriori) pour percevoir les comportements intra lot à ces températures. Les analyse statistiques sont résumées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Analyses statistiques de la stabilité des comprimés de MPM

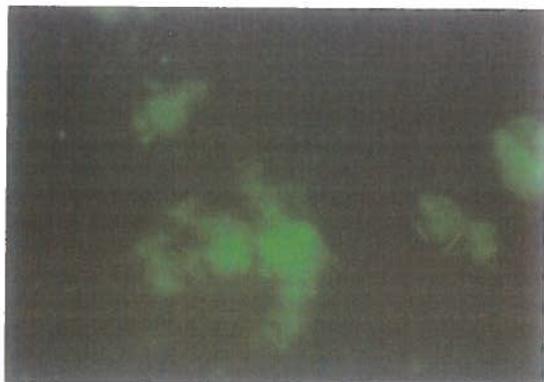
Lot	Conditions	Test Statistique	Poids	Epaisseur	Dureté
PC 008	En vrac	Oneway ANOVA	P = .012	P = .011	P < .001
		Test de Tukey	25≠60 (P=.009)	25≠40 (P=.041)	25≠40 (P<.001)
			25≠60 (P=.013)	25≠60 (P<.001)	
Triturée	Oneway ANOVA	P < .001	P = .022	P = .022	
		Test de Tukey	25≠40 (P<.001)	25≠40 (P=.017)	25≠60 (P=.017)
		25≠60 (P<.001)			
PC 009	En vrac	Oneway ANOVA	P < .001	P = .003	P < .001
		Test de Tukey	25≠40 (P<.001)	25≠40 (P=.010)	25≠40 (P<.001)
		25≠60 (P<.001)	25≠60 (P=.005)	25≠60 (P<.001)	
Triturée	Oneway ANOVA	P = .002	P = .014	P < .001	
		Test de Tukey	25≠40 (P=.004)	25≠60 (P=.015)	25≠40 (P<.001)
		25≠60 (P=.005)		25≠60 (P<.001)	
PC 010	En vrac	Oneway ANOVA	P = .004	P = .022	P = .037
		Test de Tukey	25≠40 (P=.046)	25≠40 (P=.019)	25≠60 (P=.029)
		25≠60 (P=.004)			
Triturée	Oneway ANOVA	P < .001	P < .001	P < .001	
	Test de Tukey	25≠40 (P=.001)	25≠60 (P<.001)	25≠40 (P<.001)	
		25≠60 (P<.001)	40≠60 (P<.001)	25≠60 (P<.001)	

3.3 ÉVALUATION VISUELLE DE LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE

D'un point de vue technologique, la forme des cristaux de la poudre à comprimer est très importante. Les substances médicamenteuses ont un certain nombre de propriétés physiques et chimiques qui sont souvent affectées par la taille de la particule. Le taux de dissolution du médicament, la biodisponibilité, l'uniformité du contenu, le goût, la texture, la couleur, l'écoulement, la compressibilité et la stabilité sont tous des paramètres dépendant de la taille de la particule [76]. Par conséquent, il devient très important de considérer la forme de la particule dans la formulation des médicaments.

3.3.1 ÉVALUATION DE LA FORME DES PARTICULES DE LA MPM

Une des premières approximations utilisée pour caractériser la forme et la taille des particules est la microscopie optique [77]. On s'est servi de cette technique simple pour observer la forme de la MPM humide, de la MPM lyophilisée et de la MPM-EPS lyophilisées. Les images obtenues dans cette étude donnent un aperçu général de l'organisation du réseau et sur le degré de cristallisation de la MPM. Il est important de mentionner que cette étude a généré plusieurs images et seulement les images les plus représentatives sont montrées dans ce document.



La figure 15 révèle grâce au colorant Sypro Orange (qui permet la coloration de protéines) une forme et une taille amorphe du réseau protéique de la MPM humide.

Figure 15. MPM humide coloration Sypro Orange

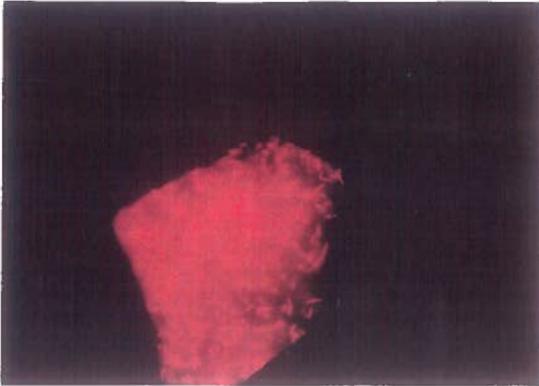


Figure 16. MPM Lyophilisée coloration Sypro Orange

La coloration de la MPM lyophilisée qui est illustrée dans la figure 16, permet d'observer que le procédé de séchage induit fortement la formation de cristaux polymorphes ce qui peut avoir un impact direct sur la libération du principe actif.

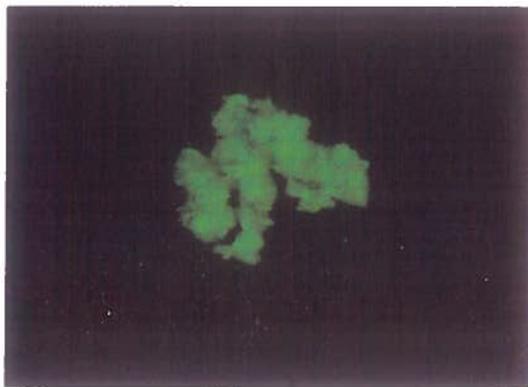


Figure 17. MPM-EPS Lyophilisées coloration Sypro Orange

L'ajout des EPS dans la MPM avant le procédé de séchage permet l'homogénéisation de la taille et de la forme des particules (figure 17). Ce qui est généralement recherché car cela minimise les problèmes de formulation.

3.3.2 VIABILITÉ DES BACTÉRIES DANS LA MPM

En utilisant la propriété de coloration des bactéries mortes et vivantes du colorant BacLight, on a observé au microscope de fluorescence comment le procédé de séchage et l'incorporation des EPS ont un effet sur la viabilité des bactéries à fort potentiel probiotique contenues dans la MPM [75]. L'évaluation visuelle a aussi permis de confirmer les résultats du sous chapitre précédent concernant la forme des particules. Encore une fois, seulement les images les plus représentatives ont été montrées.

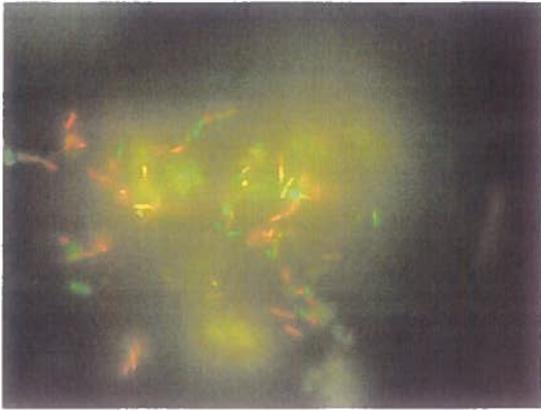


Figure 18. MPM humide coloration BacLight

La coloration avec BacLight a permis d'observer que dans la MPM humide se trouve une forte proportion de bactéries vivantes (verte) qui atteint 75 % (figure 18).

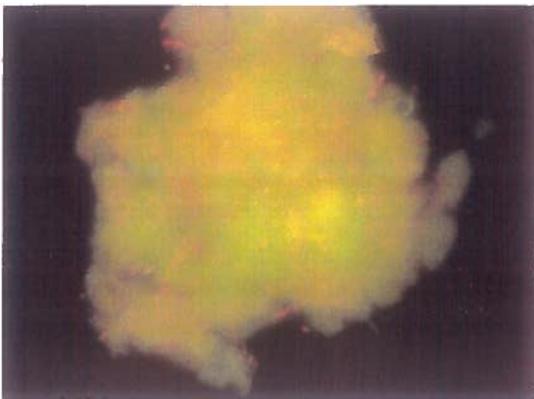


Figure 19. MPM lyophilisée coloration BacLight

Le procédé de lyophilisation a un fort impact sur la viabilité des bactéries [10].

On ne retrouve que 25 % de bactéries vivantes après le procédé de séchage.

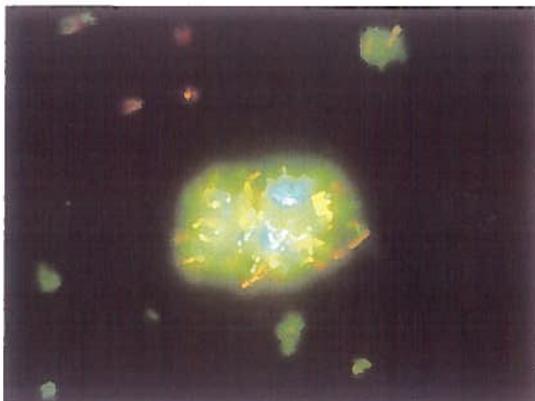


Figure 20. MPM-EPS lyophilisées coloration BacLight

La Figure 20 démontre que l'ajout des EPS dans la MPM avant le procédé de séchage permet l'homogénéisation de la taille et de la forme des particules [78]. En plus, les EPS protègent partiellement les bactéries pendant le procédé de lyophilisation ce qui peut expliquer la proportion égale des bactéries mortes et vivantes dans cette formulation [10].

3.4 ÉTUDE CINÉTIQUE *IN VITRO* DE LA LIBÉRATION D'AGENTS THÉRAPEUTIQUES

Les études de dissolution *in vitro* donnent un support afin de choisir parmi les différentes alternatives de formulation [31]. On a évalué la cinétique de libération de divers comprimés de MPM préparés par des méthodes différentes (compression directe et granulation humide) en utilisant comme principe actif une molécule hydrophile. L'acétaminophène a été choisi comme traceur car elle est une substance relativement accessible avec suffisamment de bibliographie publiée pour faciliter l'établissement d'un modèle [79]. De plus, ce principe actif a été choisi à plusieurs reprises pour modeler les études de compression de comprimés à base d'amidon [80].

3.4.1 ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION À PARTIR DES COMPRIMÉS DE MPM (COMPRESSION DIRECTE)

Il a été décidé d'étudier le comportement de la libération du principe actif (à diverses concentrations) dans les comprimés de MPM préparés par compression directe pour évaluer la méthode de fabrication la plus avantageuse pour la production de comprimés de MPM à libération prolongée. Les formulations évaluées sont indiquées dans le tableau IX.

Tableau IX: Formulations des comprimés fabriqués par compression directe

Formulation	Lot MPM	MPM (forme)	MPM % (p/p)	Acetamin. % (p/p)
A	F - 078	Sec	95 %	5 %
B	F - 078	Sec	90 %	10 %
C	F - 078	Sec	80 %	20 %

La cinétique de libération de chaque formulation a été évaluée dans deux conditions (solution gastrique et solution intestinale) et chaque essai a été réalisé en triplicata.

3.4.1.1 Cinétique de libération des comprimés dans la solution gastrique

Les résultats obtenus avec les comprimés de MPM ont été comparés à ceux du Tylenol (médicament à libération rapide contenant de l'acétaminophène) afin d'évaluer si la MPM offre un ralentissement de libération du principe actif en comparaison à ce comprimé commercial.

La figure 21 présente la cinétique de libération des comprimés de MPM à diverses concentrations d'acétaminophène ainsi que celle du Tylenol de 500 mg (325 mg d'acétaminophène, cellulose, amidon de maïs, stéarate de magnésium et glycolate sodique d'amidon). On peut observer clairement que pour les comprimés de Tylenol la molécule hydrophile est libérée complètement en 30 minutes. Parallèlement, les comprimés de MPM à 5, 10 et 20% ont une libération continue très semblable en libérant 80% du principe actif après deux heures.

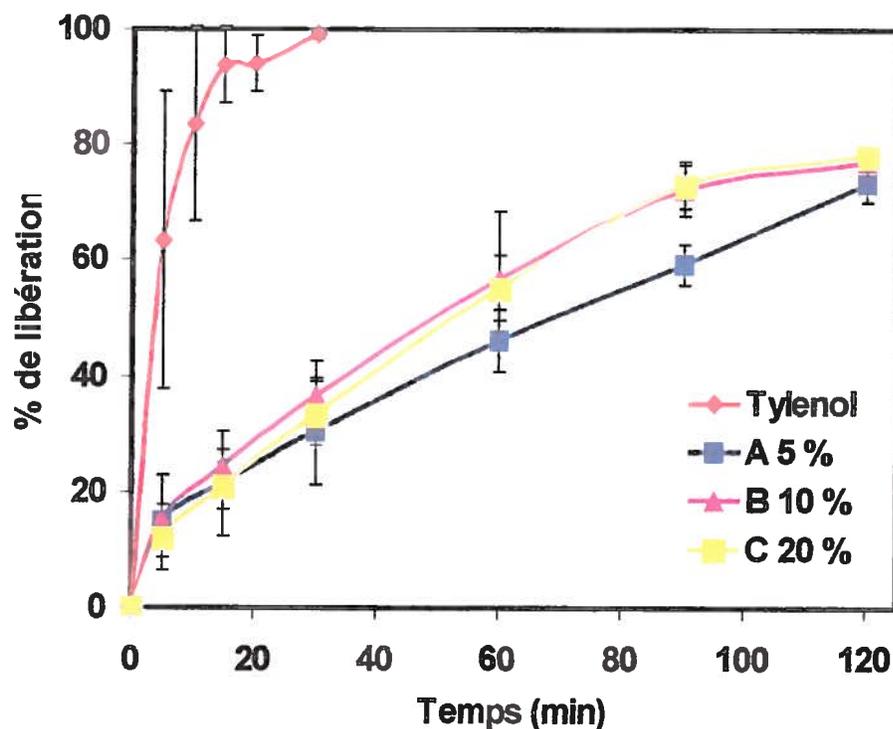


Figure 21. Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM faits par compression directe

On a remarqué que les comprimés de Tylenol ont été complètement désintégrés après 30 minutes tandis que tous les comprimés de MPM présentent un léger gonflement après deux heures.

3.4.1.2 Cinétique de libération des comprimés dans la solution intestinale

Les résultats de la cinétique de libération dans la SIF sont résumés dans la figure 22. On a obtenu un graphique échelonné avec plusieurs plateaux (entre les minutes 20-40, 60-100 et 120-160) pour les trois formulations à l'étude. Le pourcentage maximal de libération des trois formulations est de 70 % après trois heures dans la SIF.

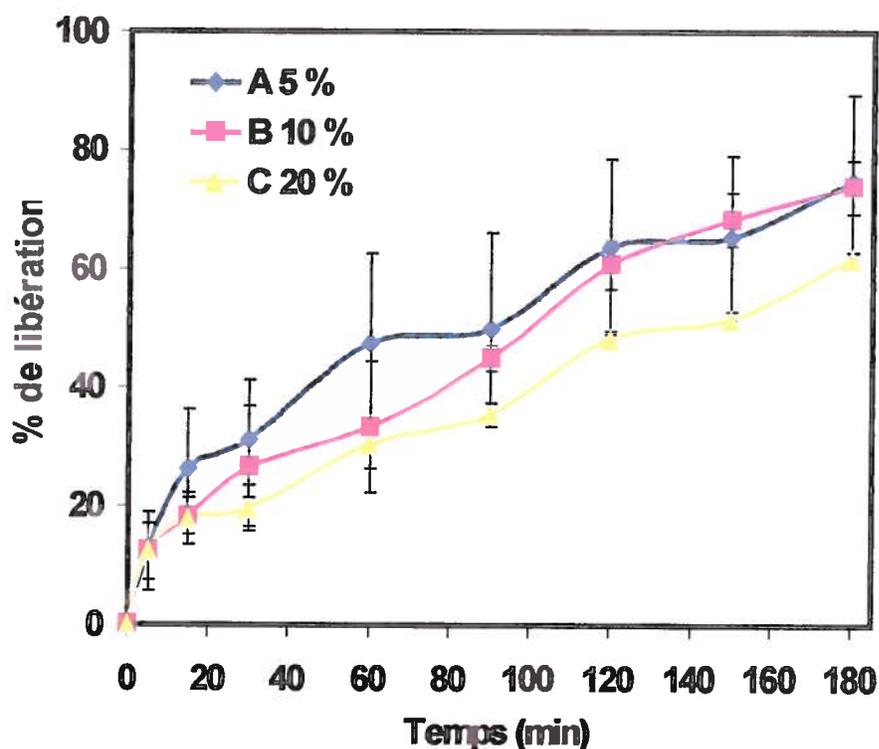


Figure 22. Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM faits par compression directe

Le Tylenol, n'a pas été utilisé comme référence dans cette expérience, car ce médicament de libération immédiate ne se rend jamais dans l'intestin pour être dissous.

3.4.2 ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION À PARTIR DES COMPRIMÉS DE MPM (GRANULATION HUMIDE)

La granulation humide est la méthode classique d'élaboration de comprimés car divers ingrédients en poudre peuvent être incorporés de façon homogène [16]. On a étudié la cinétique de libération de l'acétaminophène (à des concentrations différentes) dans des comprimés de MPM préparés par granulation humide. Les formulations évaluées sont indiquées dans le tableau X.

Tableau X : Formulations des comprimés de MPM fabriqués par granulation humide

Formulation	Lot MPM	MPM (forme)	MPM % (p/p)	Acetamin. % (p/p)
D	PC 007.2	Humide	95 %	5 %
E	PC 007.2	Humide	90 %	10 %
F	PC 007.2	Humide	80 %	20 %
G	PC 010	Humide	90 %	10 %

3.4.2.1 Cinétique de libération dans la solution gastrique

L'étude de libération du principe actif dans la solution gastrique (figure 23) démontre que la méthode de fabrication de comprimés par granulation humide permet de diminuer la vitesse de libération du traceur hydrophile (60% d'acétaminophène en deux heures) encore plus que la méthode de fabrication par compression directe. À la lumière des résultats, on peut observer que toutes les formulations à l'exception de la formulation D, présentent un profil de libération semblable. On observe aussi qu'il n'existe pas de différence entre les profils de libération des comprimés faits avec deux lots différents de MPM (formulation E et G).

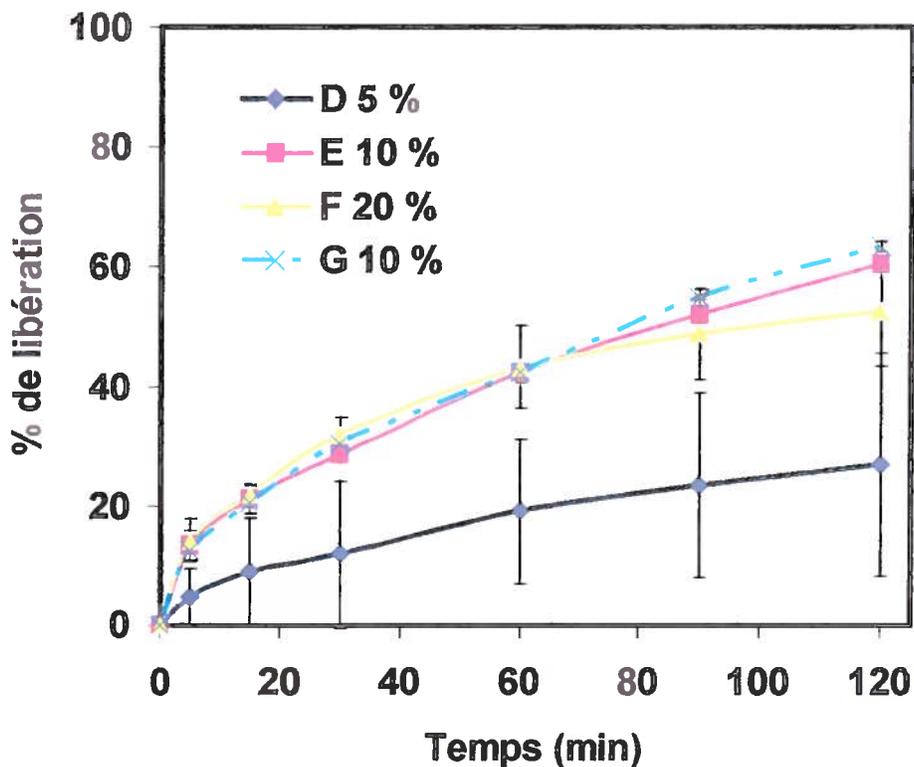


Figure 23. Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM faits par granulation humide

3.4.2.2 Cinétique de libération des comprimés dans la solution intestinale

La figure 24 présente le profil de libération des comprimés de MPM dans la solution intestinale préparés par granulation humide. Les résultats indiquent que la cinétique de libération est très semblable entre les diverses formulations. L'acétaminophène libéré après trois heures était de 55 % pour les formulations préparées avec le même lot de MPM. On peut observer aussi que la libération du principe actif a été faite dans tous les cas de façon échelonnée avec des plateaux, ce qui suggère une libération non continue dans le milieu intestinal.

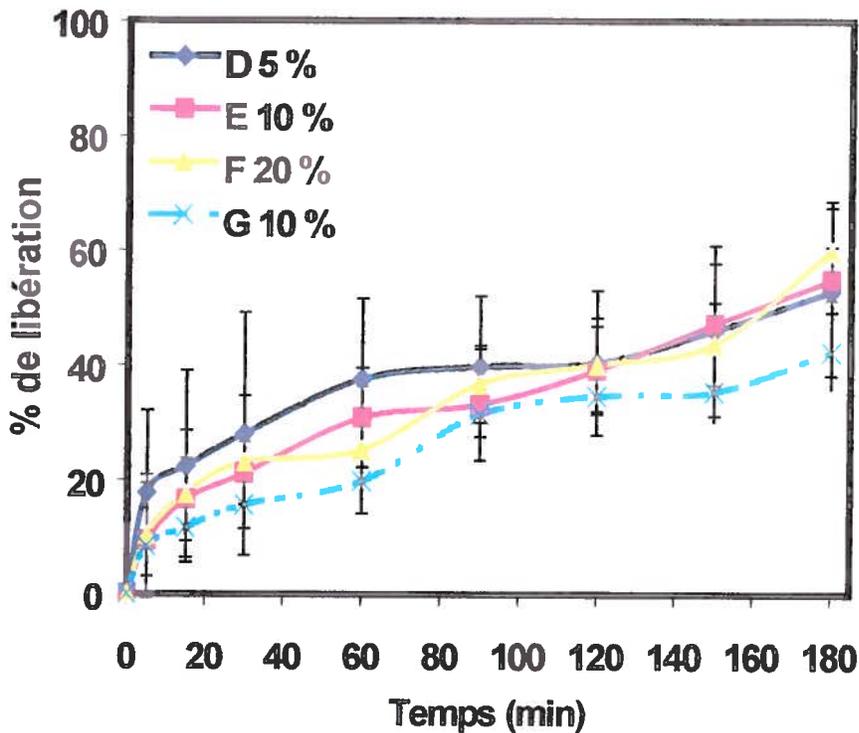


Figure 24. Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM faits par granulation humide

3.4.3 ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION À PARTIR DES COMPRIMÉS DE MPM AVEC DES EPS (GRANULATION HUMIDE)

Comme mentionné auparavant, l'ajout de polysaccharides peut fortement protéger les médicaments durant la lyophilisation [63,81,82]. Par conséquent, l'ajout des EPS à diverses concentrations a été fait pour évaluer s'ils ont un effet sur la libération du principe actif dans les comprimés préparés par granulation humide. Les formulations évaluées peuvent être consultées dans le tableau XI.

Tableau XI : Formulations des comprimés de MPM avec des EPS fabriqués par granulation humide.

Formulation	Lot MPM	MPM (forme)	MPM % (p/p)	Acetamin. % (p/p)	Lot EPS Utilisé	EPS % (p/p)
H	PC 007.2	Humide	89,8 %	10 %	ABE – 1	0,2 %
I	PC 007.2	Humide	89,4 %	10 %	ABE – 1	0,6 %
J	PC 007.2	Humide	89 %	10 %	ABE – 1	1,0 %
K	PC 010	Humide	89 %	10 %	NBE 4	1,0 %
L	PC 010	Humide	89 %	10 %	ABE – 3	1,0 %
M	PC 010	Humide	80 %	10 %	NBE 4	10,0 %
N	PC 010	Humide	70 %	10 %	NBE 4	20,0 %
O	PC 010	Humide	80 %	10 %	ABE – 3	10,0 %
P	PC 010	Humide	70 %	10 %	ABE – 3	20,0 %

3.4.3.1 Cinétique de libération des comprimés de MPM avec des EPS faits par granulation humide (solution gastrique)

Les résultats de ces expériences sont présentés sur deux graphiques pour faciliter l'observation et l'analyse des résultats. Le premier graphique (figure 25) résume les résultats des formulations H, I, J, K et L faits à faibles concentrations d'EPS (0,2 à 1,0 % p/p).

Les profils de libération des formulations à faible concentration d'EPS sont très semblables entre eux. Ces profils sont aussi similaires aux profils des comprimés faits par granulation humide sans EPS (figure 23). On peut remarquer qu'il n'y a pas de variation de profils en utilisant différents lots de MPM et d'EPS.

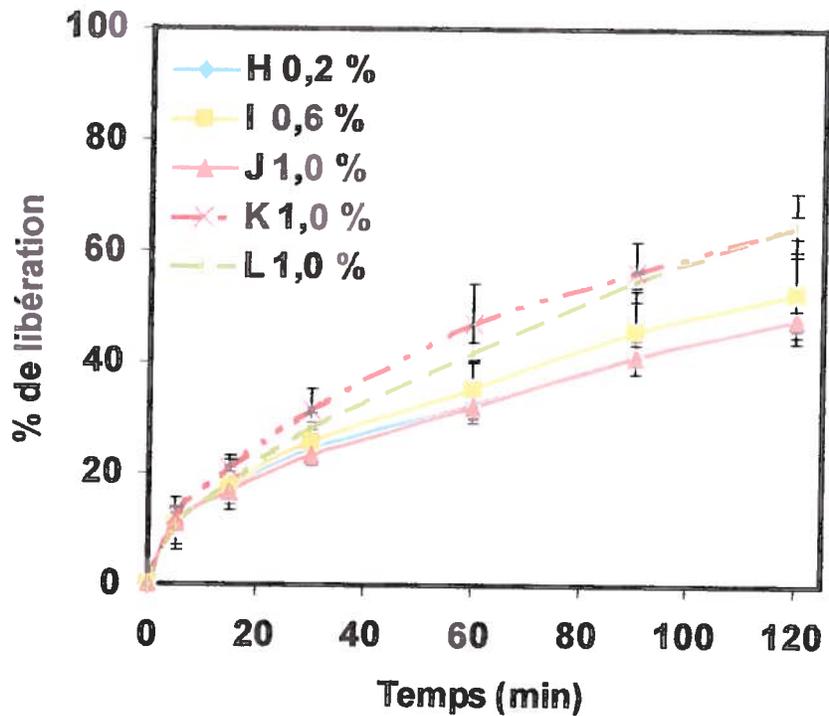


Figure 25. Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM à faible concentration d'EPS faits par granulation humide

Par ailleurs, les profils présentés dans la figure 26 sont extrêmement semblables, même si le lot d'EPS n'est pas le même dans toutes les formulations. D'ailleurs, on peut observer que l'augmentation de la proportion d'EPS dans les formulations régularise la vitesse de libération du principe actif, ce qui est représenté par les faibles écarts types.

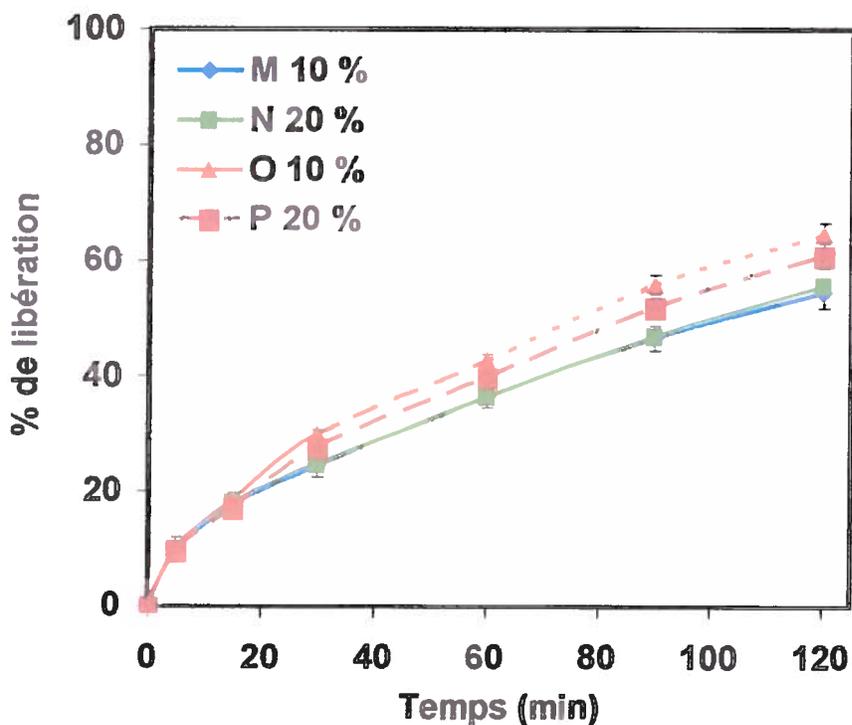


Figure 26. Cinétique de libération dans la SGF des comprimés de MPM à haute concentration d'EPS faits par granulation humide

3.4.3.2 Cinétique de libération des comprimés de MPM avec des EPS faits par granulation humide (solution intestinale)

Les résultats de ces expériences sont présentés sur deux graphiques pour faciliter l'observation et l'analyse des résultats.

La figure 27 résume les résultats des formulations H, I, J, K et L faits à faibles concentrations d'EPS (0,2 - 1,0 % p/p). Elle présente le profil de libération des comprimés de MPM à faibles concentrations d'EPS (0,2 %, 0,6 % et 1,0%) préparés par granulation humide dans la solution intestinale. Les formulations libèrent autour de 60 % de l'acétaminophène. On observe que les profils de libération des comprimés de MPM faits par granulation humide (figure 24) et de comprimés de MPM à faibles concentrations d'EPS (figure 27) sont considérablement semblables. La libération du principe actif de façon échelonnée avec des plateaux a été aussi observée.

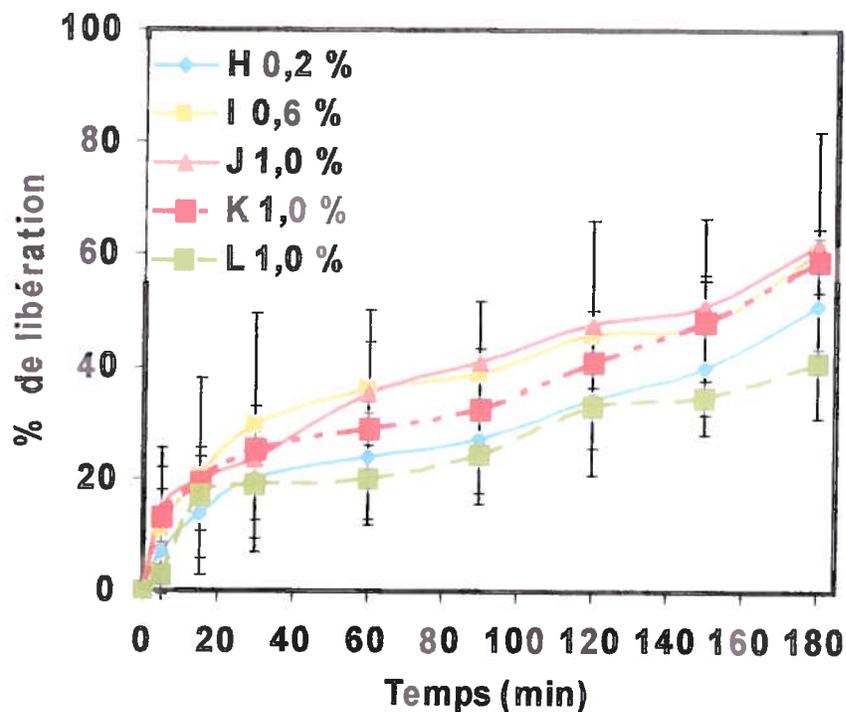


Figure 27. Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM à faible concentration d'EPS faits par granulation humide

La figure 28 confirme qu'il n'y a pas de différence considérable entre la libération totale des formulations faits avec différents lots d'EPS et de MPM. On observe aussi que les écarts types sont plus petits que ceux de la figure 27, ce qui reflète une libération plus homogène du principe actif lorsque les EPS sont ajoutés à la formulation en grande concentration.

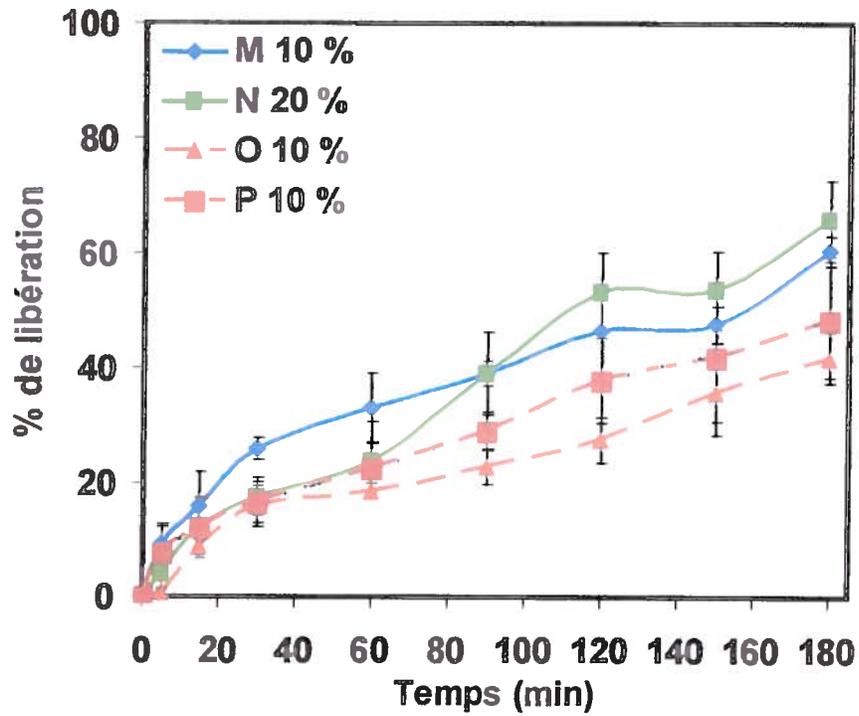


Figure 28. Cinétique de libération dans la SIF des comprimés de MPM à haute concentration d'EPS faits par granulation humide

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 LA RHÉOLOGIE DE LA MPM

Il est bien de rappeler que les produits de santé naturels ainsi que les médicaments existent majoritairement sous formes solides [17]. Il est devenu alors primordial de caractériser davantage les MPM en tant qu'excipient pour pouvoir les utiliser dans la fabrication de comprimés. Pour cela, on a procédé à la détermination de certaines caractéristiques rhéologiques (densité en vrac, densité compactée et indice de Carr) des MPM sèches, ce qui nous a permis de déterminer précisément les propriétés d'écoulement des MPM lyophilisées.

Les résultats de ces expériences ont démontré que les écarts de densité chez les MPM triturées sont beaucoup plus nets que chez les MPM en vrac. Cela peut être expliqué par le fait que les petites particules de MPM vont avoir tendance, via un phénomène de percolation, à se compacter davantage et plus facilement.

Le tableau XII fait la relation entre l'index de Carr et les propriétés d'écoulement d'un excipient [24]. Si on fait la comparaison avec les résultats obtenus (résumés dans le tableau V), on réalise que les concentrations des constituants de chaque lot de MPM sont différentes et les lots ont des propriétés d'écoulement qui vont d'excellent (PC 010) à moyen (PC 008).

Tableau XII: Indice de Carr – Indices d'écoulement

Indice	Écoulement
5 – 15	Excellent
12 – 16	Bon
18 – 21	Moyen
23 – 28	Faible

Si on compare les MPM avec les deux excipients les plus utilisés sur le marché (tableau XIII), on peut observer que la MPM devient plus avantageuse car les indices d'écoulement du tableau VIII sont compris entre 9,76 et 21,48; octroyant ainsi aux MPM triturées et en vrac des propriétés d'écoulement d'excellente à moyenne. La trituration ne

semble donc pas nuire aux propriétés d'écoulement des MPM, leur conférant alors une utilisation éventuelle en compression directe, tandis que les excipients commerciaux ont, dans certains cas, des propriétés faibles d'écoulement.

Tableau XIII : Indice de Carr d'excipients sur le marché

Lactose	Cellulose microcristalline	MPM en vrac	MPM triturée
15 - 35	17 - 29	14 – 17,35	9,76 – 21,48

4.2 LES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DES COMPRIMÉS DE MPM

Des résultats présentés auparavant ont démontré que les MPM pouvaient se comprimer en incorporant un principe actif, démontrant ainsi un potentiel irréfutable d'utilisation dans la fabrication de formes pharmaceutiques sèches. Une caractérisation galénique en profondeur des MPM a été réalisée afin de comprendre les mécanismes impliqués lors de la fabrication de comprimés de MPM.

4.2.1 LE POIDS DES COMPRIMÉS

L'étude de la masse des comprimés a mis en évidence rapidement l'existence possible de variations entre chaque lot de MPM. Il est important de rappeler que, une fois la masse cible de 200 mg atteinte, la presse n'a pas été modifiée afin de visualiser si les masses étaient reproductibles lot après lot.

Concernant les comprimés préparés avec la MPM en vrac, il est facile de constater qu'une variation de masse a été obtenue, allant de 0,1967 g à 0,2537 g, soit une augmentation de près de 29 %. Ce phénomène pourrait être expliqué par la distribution de la taille des particules de MPM en vrac, différente d'un lot à l'autre. Par contre, il est intéressant de signaler que les écarts inter lots sont similaires pour les lots PC 008 et PC 009, indiquant non seulement une meilleure uniformité de masse mais aussi une distribution de taille plus homogène, même sans triturer.

Il est important de souligner qu'il a été impossible d'obtenir des comprimés de MPM triturés par simple compression directe. En effet, la petite taille des particules et le point de fusion relativement bas des protéines, engendrent des problèmes de collage sur le poinçon de la presse (lors d'une compression industrielle, la température de surface des comprimés peut atteindre 50°C) [17]. Pour cette raison, il a été nécessaire d'ajouter du stéarate de magnésium (lubrifiant). Les masses moyennes obtenues présentaient une variation moindre d'environ 10 %, ce qui était attendu. Les tailles et distributions de taille des particules de MPM étant beaucoup plus étroite lorsque triturées, il est alors normal que les écarts présentent des variations minimales. Par contre, le lot PC 010 présentait une uniformité de masse similaire lorsque les MPM étaient triturées et en vrac. Cela met en évidence la différence entre chaque lot de MPM utilisée.

4.2.2 L'ÉPAISSEUR DES COMPRIMÉS

La moyenne des épaisseurs des comprimés faits à partir de MPM non triturée ont été d'environ 4 mm pour les lots PC 008 et PC 009. L'épaisseur de 4,53 mm pour le lot PC 010 est attribuable à la plus grande masse par comprimé (0,2537 g). Il est normal de s'attendre que le comprimé sera plus épais, si la masse de la poudre comprimée est supérieure. L'uniformité des épaisseurs des comprimés des trois lots de MPM triturée a été observée. Cette observation va de pair avec l'uniformité de masse.

4.2.3 LA DURETÉ DES COMPRIMÉS

La dureté est le terme décrivant la résistance des comprimés à la pression et à la tension exercée pendant leur transport et leur entreposage. La dureté est évaluée par le craquèlement des comprimés lors de l'application d'une force de compression [26].

Les comprimés faits avec MPM en vrac ont donné des duretés moyennes autour de 19 KN avec une bonne uniformité. Selon la USP, pour qu'un comprimé puisse supporter les conditions d'entreposage et de manipulation, une dureté d'au moins 6 KN est nécessaire [24]. Il est intéressant de souligner que la dureté des comprimés du lot PC 010 a été la même malgré une masse supérieure. Il a été clairement illustré que la dureté est maintenant corrélée non seulement avec la masse mais aussi avec l'épaisseur.

Il est important de signaler que l'ajout de stéarate de magnésium dans les formulations de comprimés à base de MPM triturée a diminué la dureté de façon variable. La constance de dureté n'a pas été du tout observée, partant de 17 KN à 13,5 KN pour finalement atteindre 8,9 KN. Par contre, l'uniformité de dureté intra lot des MPM triturées a été meilleure que pour les MPM en vrac. Encore une fois, ceci est attribuable à la taille et distribution de taille des particules de MPM triturée. La mauvaise dispersion du stéarate de magnésium lors de l'étape de lubrification peut expliquer une telle variation.

4.2.4 LA FRIABILITÉ DES COMPRIMÉS

La USP exige une friabilité plus petite ou égale à 1% pour considérer un lot de comprimés comme acceptable [24]. À la lumière de nos résultats tous nos comprimés sont dans la norme.

4.2.5 LA DÉSINTÉGRATION DES COMPRIMÉS

L'USP définit la désintégration complète comme un état dans lequel chaque résidu de comprimé, à l'exception des fragments insolubles qui restent dans le panier de désintégration, est une particule molle ne présentant aucune palpation solide possible [24]. Selon nos attentes et en se basant sur cette définition, aucune désintégration n'a été observée. Le test effectué avec les comprimés provenant des 3 lots de MPM triturée et en vrac a démontré qu'après une incubation de 4 heures dans l'eau à 37 °C, les comprimés ne se sont pas désintégrés. La pharmacopée américaine établit que pour les comprimés non enrobés, la désintégration totale du comprimé doit être effectuée en 30 minutes ou moins pour les médicaments à libération immédiate [24]. Alors, d'après l'USP, les comprimés à libération prolongée ne devraient pas faire l'objet d'étude de désintégration en tant que tel mais seulement d'études de dissolution du principe actif. Ainsi, le test de désintégration sur les comprimés de MPM a été effectué uniquement afin de démontrer que la MPM ne se prête pas pour préparer de comprimés à libération immédiate.

4.3 LA STABILITÉ DES COMPRIMÉS DE MPM

Il a été intéressant de vérifier que les comprimés utilisés pour les études mentionnées ci-haut conservaient leurs propriétés physico-chimiques en fonction de différentes conditions de température à une période de temps déterminée. Les résultats présentés dans le tableau X résument les expériences de stabilité réalisées sur trois lots de comprimés de MPM triturée et en vrac à trois températures différentes (25 °C, 40 °C et 60 °C). Pour évaluer la différence inter lots, des analyses statistiques ont été effectuées (ANOVA et Tukey) et résumées dans le tableau XI.

Comme première évaluation, l'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour déterminer s'il y avait des différences entre les trois températures. Suite à ces différences significatives obtenues, on a poursuivi avec un test de Tukey (test posteriori) pour percevoir les comportements intra lot à ces températures.

Selon les analyses statistiques, on voit une différence considérable de poids, d'épaisseur et de dureté entre les comprimés de tous les lots de MPM triturée et en vrac testés à 25 °C et 40 °C et entre ceux testés à 25 °C et 60 °C. Par contre, il n'existe pas de différence entre les lots testés à 40 °C et 60 °C. On peut observer après deux mois qu'à 25 °C les comprimés gagnent en poids et en épaisseur, tandis qu'à 40° et 60°C, le poids ainsi que l'épaisseur diminuent. Cette variation des propriétés peut être expliquée par l'humidité de l'environnement, ce qui nous amène à penser que la MPM est un matériel hygroscopique. Par ailleurs, les résultats de friabilité nous ont confirmé la stabilité de cette propriété physique et le potentiel des comprimés fait à base de MPM à résister aux conditions de transport et d'entreposage.

À la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que la MPM peut être utilisée pour produire des comprimés avec des propriétés physiques intéressantes (friabilité, dureté, désintégration et dissolution). Néanmoins, quelques-unes de ces propriétés sont affectées par l'humidité. Il faut cependant noter que cela n'empêche pas l'utilisation de la MPM comme excipient (diluant et/ou agglutinant) majoritaire dans des comprimés.

4.4 LA FORME DU RÉSEAU PROTÉIQUE

Lors de la production des formes pharmaceutiques, la forme et la taille des particules de chaque ingrédient sont importantes. Le principe actif n'est pas le seul composant à jouer un rôle important dans les propriétés physiques de la formulation. Les excipients y jouent aussi un rôle décisif. Les formes des cristaux (amorphe, polymorphe, uniforme) de chaque composant de la formulation vont définir les propriétés rhéologiques de la formulation [83].

Il est connu qu'une structure désorganisée de l'excipient est généralement reliée à un taux de dissolution rapide et celui-ci doit donc être utilisé pour la formulation de médicaments légèrement solubles [76]. Alors, une observation de la forme du réseau de la MPM a été réalisée pour essayer de comprendre les résultats obtenus ultérieurement dans l'étude de dissolution *in vitro*.

L'utilisation du colorant Sypro Orange nous a permis de mettre en évidence que les MPM sont majoritairement formées par des protéines. Cette étude a permis aussi d'observer une forme amorphe (très désorganisée) de la MPM humide, ce qui peut provoquer une cinétique de dissolution plutôt rapide. Par ailleurs, le procédé de lyophilisation a induit fortement la formation de cristaux de taille irrégulière (polymorphisme) qui peuvent provoquer des problèmes de flux de la poudre ou de compression [76]. Toutefois, l'ajout des EPS avant l'étape de lyophilisation a démontré la formation de structures de taille homogène qui pourront ralentir la vitesse de dissolution du principe actif.

D'un autre côté, l'étude de viabilité avec le colorant BacLight laisse percevoir que le procédé de lyophilisation induit la mortalité des lactobacilles dans les cristaux de MPM. Cette analyse a permis aussi de confirmer les résultats obtenus avec le colorant Sypro Orange, suggérant que l'ajout d'EPS homogénéise la taille du réseau protéique. La forme homogène des cristaux de MPM a permis d'augmenter la viabilité des lactobacilles lors de l'étape ultérieure de lyophilisation.

Ces deux types d'essai nous ont fait réaliser que l'ajout des EPS à la MPM avant le procédé de déshydratation par sublimation permet l'homogénéisation de la forme et de la taille du réseau protéique. Cela se traduit par un ralentissement de la vitesse de dissolution du principe actif ainsi que par l'élimination des problèmes d'écoulement et de compression durant la fabrication de comprimés. Il est important de mentionner que les résultats obtenus sont en accord avec ce qui a été publié dans la littérature, où l'on mentionne que l'ajout de polysaccharides protège les médicaments durant la lyophilisation [78].

4.5 LA LIBÉRATION DE L'ACÉTAMINOPHÈNE À PARTIR DES COMPRIMÉS DE MPM

Il existe trois méthodes de fabrication de comprimés: la compression directe, la granulation sèche et la granulation humide [17]. L'étude de dissolution *in vitro* qui imite les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal nous a permis d'évaluer quelle méthode de fabrication est la plus favorable à la réalisation de comprimés de MPM à libération prolongée.

L'acétaminophène est un principe actif fréquemment utilisé dans le domaine pharmaceutique pour modéliser plusieurs études de compression et de dissolution [79,80]. C'est pour cette raison qu'on a utilisé ce principe actif en tant que traceur pour la préparation des comprimés de MPM selon deux méthodes différentes (compression directe et granulation humide). Le Tylenol, médicament à libération immédiate contenant de l'acétaminophène, a servi comme référence pour comparer les profils de dissolution des comprimés préparés avec de la MPM. Cette étude nous a révélé que toutes les formulations à base de MPM préparées par les deux méthodes mentionnées auparavant, ont un profil de libération beaucoup plus lent que les comprimés de Tylenol. On a observé aussi que les comprimés de Tylenol ont été complètement désintégrés après 30 minutes dans la solution gastrique tandis que tous les comprimés à base de MPM ont été dégradés partiellement après deux heures. Cette caractéristique est recherchée pour la fabrication des comprimés à libération prolongée [84].

À la lumière des résultats des expériences de dissolution *in vitro*, on a pu déterminer que les comprimés faits par granulation humide (figure 23) libèrent plus lentement le principe actif que les comprimés élaborés par compression directe (21). Ceci peut être expliqué par le fait que dans la compression directe, la MPM a été lyophilisée avant de la mélanger avec le principe actif, ce qui peut induire la formation de cristaux polymorphes qui vont fortement influencer les propriétés physiques du comprimé ainsi que le profil de libération [79,85].

Lorsque l'on a ajouté des EPS à faible concentration (entre 0,2% et 1,0%) dans les formulations, on n'a pas observé de différence significative entre ces comprimés et ceux préparés par la même méthode (granulation humide) sans EPS. Par contre, lors de l'ajout d'EPS à une haute concentration (10% et 20%), la libération du principe actif vers le milieu de dissolution s'est effectuée librement de façon continue (figure 26). Ceci nous a fait réaliser que l'ajout d'EPS à haute concentration joue un rôle important dans le ralentissement de la vitesse de libération des principes actifs hydrophiles. Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été publiés dans la littérature, où il est rapporté que l'augmentation de la proportion de l'agent gélifiant (hydrophile) au sein d'un comprimé génère une augmentation du temps de libération (diminution de la vitesse de dissolution) [84]. L'explication proposée concernant ce phénomène est basée sur la diminution de la fraction de surface occupée par le principe actif lorsque la quantité de substance gélifiante est augmentée [84,85].

Si on fait une comparaison entre les deux solutions utilisées, on peut conclure que la libération de l'acétaminophène a été légèrement plus lente dans la solution intestinale que dans la solution gastrique. Cela peut être expliqué par le fait que l'acétaminophène a un pKa de 9,5 et par conséquent il se dissocie plus facilement dans un milieu acide telle que la solution gastrique [86]. La préférence de l'acétaminophène pour les milieux acides a été confirmée par les graphiques de dissolution qui ont démontré une libération du principe actif quasi constante dans les solutions gastriques tandis que dans les solutions intestinales, la libération de l'acétaminophène s'est fait de façon intermittente. Il est connu que l'hydratation et le gonflement de certaines matrices à base de polymères hydrophiles de nature ionique sont influencés par les variations du pH du tractus gastro-intestinal [85,87,88]. Par conséquent, la libération du principe actif à partir des matrices avec de tels polymères est dépendante du pH du milieu de dissolution.

Il est important de mentionner que tous les comprimés à base de MPM ont gonflé très lentement durant le temps de libération du principe actif. À partir de ces observations, on a soupçonné l'implication des liaisons hydrogène dans la matrice pour expliquer ce comportement particulier [87,88]. On peut donc avancer l'hypothèse que la libération de l'acétaminophène s'est effectuée par l'intermédiaire des ponts hydrogène formés dans la MPM lors de la compression [87]. La hausse du nombre de groupements hydroxyle (-OH) libres et disponibles, de même que la diminution de la rigidité de la structure macromoléculaire sont également des facteurs qui peuvent contribuer à l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène pouvant être formées [87,88]. L'ajout d'EPS semble donc favoriser les ponts hydrogène dans la matrice.

Lorsque les comprimés de MPM à haute teneur d'EPS ont été placés dans le milieu de dissolution, les comprimés se sont hydratés lentement en libérant le principe actif. Au niveau macromoléculaire, il est probable que l'eau venant du milieu de dissolution a tout d'abord déplacé les liaisons hydrogène formées (suite à la compression) entre les groupements hydroxyle des chaînes voisines des EPS avec de nouvelles associations eau - hydroxyles provoquant ainsi l'hydratation de la matrice [87]. Ce processus représente probablement l'étape limitante, responsable de la libération lente du principe actif.

La présence des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyliques des chaînes polysaccharidiques augmente d'une part, la stabilité du réseau tridimensionnel. D'autre part, elles limitent l'accès d'eau en assurant ainsi l'hydratation lente de la matrice [85,87,88]. La libération du principe actif, pour ce qui est d'un système matriciel à base de MPM-EPS, s'effectuerait donc en trois phases : le gonflement lent de la matrice contrôlé par l'intermédiaire des ponts hydrogène; la dissolution du principe actif dans la couche polymérique hydratée de la matrice; la diffusion libre du principe actif vers le milieu de dissolution. Étant donné que la vitesse de libération est limitée par le gonflement de la matrice (effectué de façon lente et à une vitesse quasi constante) la dissolution du principe actif s'effectue au fur et à mesure que les EPS s'hydratent.

Il est important de mentionner que même si notre étude de cinétique de dissolution n'a pas été effectuée avec un appareil de dissolution USP, les résultats peuvent être considérés représentatifs car tout au long des expériences on a utilisé le même équipement en imitant soigneusement les conditions d'un appareil USP (température, agitation, volume de dissolution et milieu de dissolution).

En conclusion, la production de comprimés à base de MPM à haute teneur en EPS préparés par granulation humide, devient une option prometteuse pour le ralentissement de la libération des molécules hydrophiles dans des formes orales sèches.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif principal du projet était de démontrer le potentiel de la Matrice Protéique Malléable (MPM) pour la réalisation de médicaments à action retardée en utilisant l'acétaminophène comme traceur hydrophile. La méthodologie utilisée pour atteindre cet objectif est un ensemble d'étapes que l'industrie pharmaceutique utilise couramment pour le développement des nouveaux excipients et leur contrôle de qualité. Cette méthodologie a permis de déterminer la formulation la plus avantageuse pour la production de comprimés à libération prolongée à base de MPM.

Dans le cadre du projet, quatre aspects ont été évalués. Il s'agit de la caractérisation des propriétés physiques de la MPM lyophilisée, la stabilité des comprimés préparés avec de la MPM, la forme du réseau protéique ainsi que la cinétique de libération du principe actif dans de comprimés de MPM. Ce sont ces analyses qui ont été présentées dans le présent document. Voici en résumé les résultats obtenus pour ces quatre études.

Les propriétés rhéologiques des MPM ont démontré que cet excipient possède de bonnes propriétés d'écoulement un fois lyophilisée. À présent, il est connu que les MPM sont composées de différents constituants. L'écoulement des MPM lyophilisées dépend alors non seulement de leur taille et de leur distribution de la taille mais aussi de la quantité et de la qualité de ces différents constituants. Pour sa part, l'étude de stabilité des comprimés de MPM a permis de mettre en évidence l'hygroscopicité de la MPM, ce qui se traduit par le besoin d'un bon emballage qui empêchera l'humidité d'affecter le produit.

Par ailleurs, l'étude de la forme du réseau protéique a révélé que l'ajout des EPS avant le procédé de lyophilisation permet l'homogénéisation de la taille des particules ainsi que la protection des lactobacilles à haut potentiel probiotique contenus dans la MPM. Ces résultats complètent ce qui a été publié dans la littérature, où l'on mentionne que l'ajout de polysaccharides protège les médicaments durant la lyophilisation [78].

Finalement, l'étude de la cinétique de libération de l'acétaminophène a démontré que la méthode la plus avantageuse pour la fabrication des médicaments à libération retardée à base de MPM est la granulation humide. Les cinétiques de dissolution ont démontré aussi qu'il est possible de faire varier la vitesse de libération d'un principe actif hydrosoluble suite à l'ajout des EPS. La présence des liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyliques des chaînes de polysaccharides limitent l'accès d'eau en assurant ainsi l'hydratation lente de la matrice, conduisant ainsi à la libération lente du principe actif [87,88].

Toutes ces études nous ont fait réaliser le fort potentiel de la MPM en tant qu'excipient (diluant et/ou agglutinant) dans la formulation de principes actifs hydrophiles. Pour l'avenir, il serait alors intéressant de déterminer aussi leur potentiel pour formuler de principes actifs hydrophobes ainsi que l'étude de l'interaction du principe actif avec la MPM pour améliorer l'absorption de la molécule active.

REMERCIEMENTS / AGRADECIMIENTOS

La réalisation de ces travaux sont le résultat de la collaboration de plusieurs intervenants qui ont eu l'amabilité de m'aider et de me conseiller de façon constructive. Premièrement, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Claude Dupont qui, grâce à sa patience et à son encadrement, m'a permis de développer un esprit critique. J'aimerais remercier aussi le Dr Pierre Lemieux pour ses conseils et son grand support ainsi que le Dr François Xavier Lacasse pour les conseils techniques et, finalement, le Dr François Shareck pour tous ses conseils judicieux.

De façon plus personnelle, je voudrais remercier le soutien et les encouragements de mon cher Sébastien Roberge ainsi que l'appui reçu de tous mes amis et collègues de l'INRS-Institut Armand-Frappier et de chez Technologies Biolactis Inc. qui m'ont aidé à me sentir comme chez moi au Québec.

Una vez más, quiero agradecer a mis queridos padres el Ing. Raúl Arroyo Osorio y la Dra. Maria del Rocio Galicia Arana que nunca han dejado de confiar en mi y me han brindado siempre todo su apoyo para alcanzar todas mis metas. Esta obra va dedicada a ustedes. Los amo y siempre estarán en mis pensamientos.

BIBLIOGRAPHIE

1. PONCHEL, G., J.M. Irache. 1998. «Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract». Adv. Drug Deliv. Rev. 34 (1) : 191-219.
2. MORITA, T., Y. Horikiri, H. Yamahara, T. Suzuki, H. Yoshino. 2000. «Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture». Pharm. Res. 17 (11) : 1367-1373.
3. PILOTE, D. 2002. «Optimisation des conditions de fermentation de la souche ES R2C2 pour la valorisation du lactosérum». Mémoire de maîtrise M748, Canada, INRS-Institut Armand-Frappier.
4. GOMES, A.M. P., F.X. Malcata. 1999. «Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas». Bol. Biotec. 64 (1) : 12-22.
5. SEMIH, O., O. Cagindi. 2003. «Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects». Pak. J. of Nut. 2 (2) : 54-59.
6. SANTOS, A., M. San Mauro, A. Sanchez, J.M. Torres, D. Marquina. 2003. «The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir». Syst. Appl. Microbiol. 26 (1) : 434-437.
7. ROERDINK, F.H., A.M. Kroon. 1989. Drug carrier systems. U.K. : John Wiley & Sons. Vol. 9.
8. MORITA, T., Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino. 2001. «Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres». Eur. J. Pharm. Biopharm. 51 (1) : 45-53.
9. BEAULIEU, L., L. Savoie, P. Paquin, M. Subirade. 2002. «Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process : application for the protection of retinol». Biomacromolecules. 3 (1) : 239-248.
10. KAILASAPATHY, K. 2002. «Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications». Curr. Issues Intest. Microbiol. 3 (1) : 39- 48.
11. KNOOP, S.J., D.E. Worden. 1988. «The pharmaceutical drug development process : an overview». Drug Inform. J. 22 (1) : 259-268.
12. LEHNE, R.A. 2001. Pharmacology for nursing care. USA: W.B. Saunders Company.

13. SKELLY, J.P., L.G. Amidon, W.H. Barr, L.Z. Benet, J.E. Carter, J. R. Robinson, V.P. Shah, A. Yacobi. 1990. «In vitro and in vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms». Pharm. Res. 7 (9) : p.975-982.
14. ANSEL, H., N Popovich, G. Short. 1990. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. USA: Lea and Febiger eds.
15. ROWE, R.C., P.J. Sheskey, P.J. Weller. 2003. Handbook of pharmaceutical excipients. U.K. : The Pharmaceutical Press.
16. OSOL, A., Chase, G.D, Gennaro, A.R., Gibson, M.R., Granberg, C.B., Harvey, S.C., King, R.E., Martin, A.N., Swinyard, E.A., Zink, G.L. 1980. Remington's pharmaceutical science. USA : Mack Publishing Company.
17. LIEBERMAN, H.A., L. Lachman. 1980. Pharmaceutical dosage forms : Tablets volume I. USA : Marcel Dekker.
18. LIU, L.S., M.L. Fishman, J. Kost, K.B. Hicks. 2003. «Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route». Biomaterials. 24 (1) : 3333-3343.
19. DEL RIO, L.A. 2002. «Estudio de preformulación para el desarrollo de comprimidos de indometacina como sustancia policristalina». Ars Pharm. 43 (1) : 147-171.
20. TORELLÓ, M., A. Viscasillas, A. Artalejo, A. Del Pozo. 2003. «Desarrollo de un nuevo excipiente para compresión directa: Estudio comparativo de excipientes multifuncionales». VI Congreso de la Sociedad Espanola de Farmacia Industrial y Galénica (Grenade, 9-11 février 2003). p. 55-56.
21. WIENIAWSKI, W. 1975. «Role and functions of the International Pharmacopoeia». Ann Ist Super Sanita. 11 (3) : 204-210.
22. BANES, D. 1975. «Information chapters in pharmacopoeias». Ann Ist Super Sanita. 11 (3) : 290-295.
23. GUERIN, E., P. Tchoreloff, B. Leclerc, D. Tangry, M. Deleuil, G. Courraze. 1999. «Rheological characterization of pharmaceutical powders using tap testing, shear cell and mercury porosimeter». Inter. J. Pharm. 189 (1) : 91-103.
24. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. 2004. The United States Pharmacopeia (USP 27). USA.
25. CHAMARRO-AGUILERA, M.R., M.A. Salvadó Lladós, JM. Suné Negre. 1991. «Estudio farmacotécnico de diferentes marcas de comprimidos de famotidina teóricamente equivalentes». Ciencia Pharm. 3 (1) : 157-168.

26. BROOK, D.B., K. Marshall. 1968. «Crushing-strength of compressed tablets I». J. Pharm. Sci. 57 (3) : 481-484.
27. ALDERBORN, G., C. Nyström. 1982. «Studies on direct compression of tablets : The effect of particle size on the mechanical strength of tablets». Acta Pharm. Suec. 19 (1) : 381-390.
28. FARHAT, R., MC Bedmar, A. Cerezo. 2003. «Elaboración y caracterización de comprimidos de Diazepam y Piridoxina». VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (Grenade, 9-11 février 2003). p. 107-110.
29. COHEN, J.L., B.B. Hubert, L.J. Leeson, C.T. Rhodes, J.R. Robinson, T.J. Roseman, E.Shefter. 1990. «The development of USP dissolution and drug release standards». Pharm. Res. 7 (10) : 983-987.
30. SHAH, V.P., J.J. Konecny, R.L Everett, B. McCullough, A.C. Noorizadeh, J.P. Skelly. 1989. «In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants». Pharm. Res. 6 (7) : 612-618.
31. SIEWERT, M. 1995. «FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products». Pharm. Ind. 57 (1) : 362-369.
32. SINGH, S. 1999. «Drug stability testing and shelf-life determination according to international guidelines». Pharm. Tech. 23 (1) : 68-86.
33. SANTÉ CANADA. 2003. Essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteux. ICH thème Q1A(R2). Canada.
34. DIFEO, T.J. 2003. «Drug product development : A technical review of chemistry, manufacturing, and controls information of the support of pharmaceutical compound licensing activities». Drug Dev. and Ind. Pharm. 29 (9) : 939-958.
35. CROWLEY, P. J. 1999. «Excipients as stabilizers». Pharm. Sci. Tech. Today. 6 (2) : 237-243.
36. JACKSON, K., Young, D., Pant, S. 2000. «Drug-excipients interactions and their affect on absorption». Pharm. Sci. Tech. Today. 10 (3) :336-345.
37. HERNANDEZ, F. 2001. «Comprimido». Panacea. 6 (2) : 57-59.
38. BOHINSKI. 1998. Bioquímica. USA: Ed. Addison-Wesley Iberoamericana.
39. VIGNOLA, C.L. 2002. Science et technologie du lait. Canada: Presses Internationales Polytechnique.

40. ALAIS, C. 1998. Ciencia de la leche. México: Ed. CECSA.
41. PÉREZ-FEÁS, C., C. Souto, R. Martínez-Pacheco. 2003. «Utilidad de mezclas celulosa microcristalina-celulosa microfina como excipientes base en extrusión-esferonización». VI Congreso de la Sociedad Espanola de Farmacia Industrial y Galénica (Grenade, 9-11 février 2003). p. 311-314.
42. FERRERO, MC., N. Munoz, A. Munoz, MR. Jiménez-Castellanos. 1996. «Excipientes de comprimidos: Disgregantes I. Mecanismos de acción». Ciencia Pharm. 6 (1) : 281-288.
43. ARTALEJO-ORTEGA, B., A. Bamio-Nuez, C. Faulí-Trillo, A. Del Pozo Carrascosa. 1998. «Comportamiento y evaluación de los lubricantes». Ciencia Pharm. 8 (2) : 59-68.
44. SIMARD, E., D. Pilote, C. Dupont, N. Lajoie, P. Marcel, P. Lemieux, P. Goyette. 2003. «Malleable Protein Matrice and uses thereof». World Intellectual Property Organisation. USA. PCT/CA02/01988.
45. GONZALEZ, M.I. 1996. «The biotechnological utilisation of cheesewhey : a review». Biores. Tech. 57 (1) : 1-11.
46. CAYOT, P., Lorient D. 1998. Structures et technofonctions des protéines du lait. Paris : Lavoisier, Technique et documentation.
47. DE WIT, J.N. 1998. «Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products». J. Dairy Sci. 81 (3) : 597-608.
48. BRIX, S., L. Bovetto, R. Fritsché, V. Barkholt, H. Frokiaer. 2003. «Immunostimulatory potential of β -lactoglobulin preparations : Effects caused by endotoxin contamination». J. of Allergy Clin. Immunol. 112 (6) : 1216-1222.
49. WONG, K.F., N. Middleton, M. Montgomery, M. Dey, R.I. Carr. 1998. «Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions». J. of Dairy Sci. 81 (7) : 1825-1832.
50. USHIDA, Y., Y. Shimokawa, H. Matsumoto, T. Toida, H. Hayasawa. 2003. «Effects of bovine α -lactalbumin on gastric defence mechanisms in native rats». Biosci. Biotech. Biochem. 67 (3) : 577-583.
51. HAKKAK, R., S. Korourian, S. R. Shelnut, S. Lensing, M.J.J. Ronis, T. M. Badger. 2000. «Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-Dimethylben anthracene-induced mammary tumors in female rats». Cancer Epidem. 9 (1) : 113-117.

52. MIYAUCHI, H., S. Hashimoto, M. Nakajima, I. Shinoda, Y. Fukuwatari, H. Hayasawa. 1998. «Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: Identification of its active domain». Cell. Immunol. 187 (1) : 34-37.
53. NIBBERING, P.H., E. Ravensbergen, M.M. Welling, L.A. Van Berkel, P.H.C. Van Berkel, E.K.J. Pauwels, J.H. Nuijens. 2001. «Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria». Inf. and Imm. 69 (3) : 1469-1476.
54. KORHONEN, H., P. Marnila, HS. Gill. 2000. «Bovine milk antibodies for health». J. Nut. 84 (1) : S135-46.
55. YOSHIKAWA, M., H. Fujita, N. Matoba, Y. Takenaka, T. Yamamoto, R. Yamauchi, H. Tsuruki, K. Takahata. 2000. «Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases». BioFactors. 12 (1) : 143-146.
56. YAMAMOTO, N. 1997. «Antihypertensive peptides derived from food proteins». Biopoly. 43 (2) : 129 – 134.
57. INGRAHAM, J.L., Ingraham C.A. 1997. Introduccion a la microbiologia. Espana: Ed. Reverté.
58. DE ROISSART, H., F.M. Luquet. 1994. Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica. Vol.2.
59. SCHREZENMEIR, J., M. De Vrese. 2001. « Probiotics, prebiotic, and synbiotics approaching a definition». Am. J. Clin. Nut. 73 (2) : 361-364.
60. OUWEHAND, A.C., S. Salminen, E. Isolauri. 2002. «Probiotics : An overview of beneficial effects». Antonie Van Leeuwenhoek. 82 (4) : 279-289.
61. VANCANNEYT, M., J. Mengaud, I. Cleenwerck, K. Vanhonacker, B. Hoste, P. Dawyndt, MC. Degivry, D. Ringuet, D. Janssens, J. Swings. 2004. «Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988». Int. J. of Syst. Evol. Microbiol. 54 (2) : 551-556.
62. VAUGHAN, E., M.C. de Vries, E.G. Zoetendal, K. Ben-Amor, A.D.L. Akkermans, W.M. de Vos. 2002. «The intestinal LABs». Antonie Van Leeuwenhoek. 82 (4) : 341-352.
63. TOBA, T., H. Uemura, T. Mukai, T. Fujii, T. Itoh, S. Adachi. 1991. «A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains». Int. J. Syst. Bact. 38 (1) : 12-14.

64. MAEDA, H., X. Zhu, S. Suzuki, K. Suzuki, S. Kitamura. 2004. «Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B». Agri. Food Chem. 52 (17) : 5533–5538.
65. ERICKSON, K.L., N.E. Hubbard. 2000. «Probiotic immunomodulation in health and disease». J. Nut. 130 (2) : 403S-409S.
66. YAN, F., D.B. Polk. 2002. «Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells». J. Biol. Chem. 277 (52) : 50959-50965.
67. YANG, Z. 2000. «Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties». Academic Dissertation, Finland, University of Helsinki.
68. FRENGOVA, G.I., E.D. Simova, D.M. Beshkova, Z. I. Simov. 2002. «Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains». Z. Naturforsch. 57 (10) : 805-810.
69. MUROFUSHI, M., Z. Mizuguchi, K. Aibara, T. Matuhasi. 1986. «Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice». Immunopharmacology. 12 (1) : 29-35.
70. KITAZAWA, H., T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko, T. Itoh. 1998. «Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*». Int. J. Food Microbiol. 40 (3) : 169-175.
71. MUROFUSHI, M., M. Shiomi, K. Aibara. 1983. «Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice». Jpn. J. Med. Sci. Biol. 36 (1) : 49-53.
72. SHIOMI, M., K. Sasaki, M. Murofushi, K. Aibara. 1982. «Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain». Jpn. J. Med. Sci. Biol. 35 (1) : 75-80.
73. TIRELL, D., Donaruma, G., Turek A. 1985. Macromolecules as drugs and as carriers for biologically active materials. USA: The New York Academy of Sciences Vol. 446.
74. MORRIS, K.R., Nail, S.L., Peck, G.E., Byrn, S.R., Griesser, U.J., Stowell, J.G., Hwang, S.J., Park, K. 1999. «Advances in pharmaceutical materials and processing». Pharm. Sci. Tech. Today. 6 (2) : 235-245.

75. AUTY, M.A.E., G.E. Gardiner, S.J. McBrearty, E.O. O'Sullivan, D.M. Mulvihill, J.K. Collins, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, R.P. Ross. 2001. «Direct *in situ* viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy». App. Env. Microbiol. 67 (1) : 420-425.
76. FLORENCE, A.T., D. Attwood. 1998. Physicochemical principles of Pharmacy. 3rd Edition. U.K. MacMillan Press Ltd.
77. ALMEIDA-PRIETO, S., J. Blanco-Mendez, F.J. Otero-Espinar. 2003. «Evaluación morfológica de partículas mediante análisis de imagen. Ejemplo de la necesidad de homogeneización y armonización de criterios». VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (Grenade, 9-11 février 2003). p. 201-204.
78. HELLER, MC., JF. Carpenter, TW. Randolph. 1997. «Manipulation of lyophilization-induced phase separation : Implications for pharmaceutical proteins». Biotechnol. Prog. 13 (5) : 590-596.
79. GUYOT, JC., L. Tete, S. Tak Fak, A. Delacourte. 1992. «Practical interest of the cohesion index for the technological formulations of tablets». 6th International Congress Pharmaceutical Technology APGI. (Paris, 1992). p. 246-254.
80. JOACHIM, J., G. Kalantzis, G. Joachim, JP. Reynier, P. Piccerelle, JM. Ruiz. 1994. «Pregelatinized starches in wet granulation. Experimental design and data analysis II. Case of tablets». STP Pharma Sci. 6 (4) : 482-486.
81. PILLAI, O., R. Panchagnula. 2001. «Polymers in drug delivery». Curr. Op. in Chem. Biol. 5 (4) : 447-451.
82. BERNKOP-SCHNÛRCH, A. 1999. «Chitosan and its derivatives : potential excipients for peroral peptide delivery systems». Int. J. Pharm. 194 (1) : 1-13.
83. WELLS, J.I., M.E. Aulton. 1988. Pharmaceutics : The science of dosage from design. USA : Churchill Livingstone.
84. BURI, P., E. Doelker. 1980. «Formulation des comprimés à libération prolongée, matrices hydrophiles». Phar. Acta Helv. 55 (8) : 189-197.
85. ISPAS-SZABO, P., F. Ravenelle, I. Hassan, M. Preda, MA. Mateescu. 2000. «Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release». Carbohydr. Res. 323 (4) : 163-175.
86. MERCK & CO. INC. RAHWAY (éd.). 1996. The Index Merck. 12th Ed. USA. Merck & Co. Inc. Rahway.

87. LENAERTS, V., I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, MA. Mateescu, L. Cartilier, R. Marchessault. 1998. «Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances». J. Cont. Rel. 53 (3) : 225-234.
88. MULHBACHER, J., P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts, MA. Mateescu. 2001. «Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings». J. Cont. Rel. 76 (1) : 51-58.

ANNEXE 1

MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Acétaminophène (Sigma Chem. Co.)
- BacLight (Molecular Probes, Inc.)
- Bile (Sigma Chem. Co)
- Chlorure de sodium (Fisher Scientific)
- Pancreatine (Fisher Scientific)
- Pepsine (Fisher Scientific)
- Phosphate de potassium monobasique (Fisher Scientific)
- Sypro Orange (Molecular Probes, Inc.)
- Tylenol comprimés de 500mg

Tous les lots de MPM utilisés tout au long de cette étude ont été fournis par Technologie Biolactis Inc. Les lots des Exopolysaccharides provenant des souches INIX et R2C2 ont été fournis par les membres de l'équipe du Dr. Claude Dupont.

LISTE DES INSTRUMENTS

- Étuve
- Fermenteur BioFlo Model C30
- Lyophilisateur
- Microscope de fluorescence
- Pharma test type PTB 301
- Presse Carver
- Presse Manesty Single Punch F3
- Spectrophotomètre UV
- Vander Kamp Disintegration tester
- Vander Kamp Tamp density tester
- VanKel Friabilator