

**UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE**

**THESE DE DOCTORAT**

Spécialité « Pharmacie en Sciences physicochimiques et Ingénierie appliquée à la santé »

**HOANG THI THANH HUONG**

**DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE MEDICAMENTS  
A USAGE PEDIATRIQUE**

**Masquage de goût du principe actif et fabrication de minigranules à désintégration rapide**

*Thèse dirigée par Madame FLAMENT Marie-Pierre*

Soutenue le 25 septembre 2012

Composition du jury:

**Madame FLAMENT Marie-Pierre**

*Professeur à l'Université de Lille 2*

Directeur de thèse

**Madame CHAMBIN Odile**

*Professeur à l'Université de Bourgogne*

Rapporteur

**Madame EVRARD Brigitte**

*Professeur à l'Université de Liège*

Rapporteur

**Monsieur GREK Vincent**

*Président de la Société O4CP*

Examineur

**Monsieur NUNS Nicolas**

*Ingénieur de recherche au Pôle régional d'Analyse de Surface*

Examineur

## *Remerciements*

*Mes premiers remerciements reviennent à Madame Marie-Pierre Flament, qui m'a encadrée et dirigé l'ensemble de cette thèse, mais également qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mon parcours pendant tant d'années en France.*

*Je tiens à vous remercier sincèrement de votre enseignement, de votre patience et de votre inestimable disponibilité.*

*C'est avec émotion que je vous exprime ma plus profonde gratitude et mon plus grand respect, en espérant être digne de la confiance que vous avez placée en moi.*

*Je tiens à adresser mes remerciements sincères aux membres du jury,*

*A Madame Odile Chambin,*

*Je vous suis reconnaissante de m'avoir offert généreusement votre temps en acceptant la charge de rapporteur et d'être présente dans le jury de cette thèse.*

*Veillez trouver ici le témoignage de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.*

*A Madame Brigitte Eviard,*

*Je vous remercie de l'intérêt et du temps que vous m'avez accordé en acceptant de juger ce travail en tant que rapporteur et d'être présente dans le jury.*

*Soyez assurée de mon grand respect et ma sincère gratitude.*

*A Monsieur Vincent Grek,*

*Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant, malgré votre emploi de temps chargé, de faire partie au jury de cette thèse.*

*Veillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mes respectueuses considérations.*

*A Monsieur Nicolas Nuns,*

*Je vous suis reconnaissante de m'avoir fait le grand plaisir en acceptant de juger ce travail.*

*Je vous remercie de votre gentillesse, de votre disponibilité, de vos précieuses explications concernant les analyses de ToF-SIMS ainsi que votre temps consacré à relire et à corriger une partie de ce manuscrit.*

*Soyez assuré de ma très sincère gratitude.*

## *Remerciements*

*A Monsieur Jürgen Siepmann,*

*Qui m'a donné l'occasion de m'intégrer au sein de son équipe de recherche.*

*Son enseignement, son soutien et son accueil toujours chaleureux ont été indispensables dans la réalisation de ce travail.*

*Qu'il soit assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.*

*J'aimerais témoigner mes respectueuses considérations à tous qui m'ont apporté leur aide, leur expertise et leur disponibilité à l'avancement de ce travail, en particulier :*

*A Monsieur Mohamed Lemdani, pour son soutien inappréciable et son temps consacré à relire et corriger une partie de ce manuscrit concernant le plan d'expériences,*

*A Monsieur Sylvain Morel et Madame Fatma Ayouni, pour leur aide précieuse dans la réalisation des analyses sur la langue électronique,*

*A Monsieur Marc Descamps, Monsieur Ahmed Addad et Madame Florence Danède, pour leur apport considérable aux analyses de la microscopie électronique à balayage et de la diffraction de rayon X,*

*A Monsieur Arnaud Beaurain et Madame Anne-Sophie Mamede, pour leur énorme travail apporté à la spectroscopie des photoélectrons X,*

*A Madame Florence Siepmann, pour ses conseils fructueux dans la mise au point des essais sur l'analyseur de texture mais également pour son soutien attentif dans les démarches au laboratoire,*

*A Madame Nouria Fatah, pour sa disponibilité et son aide précieuse aux analyses de la porosimétrie au mercure et de l'absorption gazeuse.*

## *Remerciements*

*A Madame Anne Gayot,*

*Qui m'a fait bénéficier de son accueil et de son enseignement sur la galénique.*

*Son rigueur scientifique ainsi que son esprit critique me sont un modèle.*

*Qu'elle trouve dans ces lignes mon grand respect et ma très sincère gratitude.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à l'ensemble du personnel au Laboratoire*

*Pharmacotechnie Industrielle où ce travail a été réalisé, en particulier à Hugues Florin et à*

*Muriel Deudon pour leur support considérable dans le quotidien au laboratoire.*

*Je souhaite également remercier mes camarades du laboratoire – Anh Phuong, Céline, Steffi,*

*Susi, Minh Phuong, Yvonne, Emilie, Carine, Youness – pour les bons moments passés en*

*leur compagnie, en particulier, grâce à eux que j'avais fait tellement de progrès dans la*

*langue française.*

## *Remerciements*

*J'aimerais dédier ce travail,*

*A mes très chers amis,*

*Qui m'ont toujours épaulée dans les meilleurs moments mais aussi dans les moments les plus difficiles.*

*A ma famille et à ma belle famille,*

*Qui sont toujours à mes côtés même de très loin.*

*Sans qui je ne serais pas là aujourd'hui.*

*Enfin, un merci à Nam tout simplement pour sa présence si unique.*

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX .....	xii
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
Introduction .....	2
Objectif du travail.....	4
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	6
1. Réglementation relative aux médicaments pédiatriques .....	7
1.1. Historique .....	7
1.2. Objectifs .....	8
1.3. Le comité pédiatrique .....	10
1.4. Le Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) .....	11
1.5. Procédures d'autorisation de mise sur le marché .....	13
1.6. Récompenses et incitations.....	14
1.7. Développement d'un Réseau Européen de Recherche en Pédiatrie .....	15
1.8. Particularités des essais cliniques pédiatriques .....	17
2. Particularités des paramètres pharmacocinétiques en pédiatrie .....	20
2.1. Définition et classification de la population pédiatrique .....	20
2.2. Particularités de l'absorption.....	20
2.2.1. Voie orale .....	20
2.2.2. Voie rectale.....	22
2.2.3. Voie cutanée .....	22
2.2.4. Voie intramusculaire .....	23
2.2.5. Voie intraveineuse .....	24
2.3. Particularités de la distribution.....	24
2.4. Particularités du métabolisme.....	27
2.5. Particularités de l'élimination.....	29
3. Formulation pédiatrique .....	31
3.1. Facteurs influençant le choix de la voie d'administration.....	31
3.2. Formes galéniques .....	33
3.2.1. Voie orale .....	33

3.2.1.1. Formes liquides .....	33
3.2.1.2. Formes solides .....	35
3.2.2. Voie buccale et sublinguale.....	36
3.2.3. Voie nasale .....	37
3.2.4. Voie rectale.....	38
3.2.5. Voie cutanée .....	39
3.2.6. Voie parentérale.....	40
3.2.7. Voie pulmonaire .....	43
3.3. Choix de la forme galénique en fonction de l'âge.....	43
3.4. Palatabilité .....	45
3.4.1. Amélioration de la palatabilité des formulations pédiatriques .....	45
3.4.2. Méthode d'évaluation de la palatabilité .....	47
3.5. Excipients .....	51
3.5.1. Conservateurs .....	52
3.5.2. Edulcorants .....	53
3.5.3. Diluants et solvants.....	55
3.5.4. Colorants.....	56
4. Conclusion.....	57
Références .....	58

**PARTIE EXPERIMENTALE..... 63**

**Chapitre I : Développer et évaluer le masquage de goût du principe actif réalisé par atomisation-séchage. Cas appliqué à l'acétaminophène ..... 64**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF TASTE-MASKED DRUG FOR PAEDIATRIC MEDICINES – APPLICATION TO ACETAMINOPHEN..... 65**

**Abstract..... 65**

**1. Introduction .....** 66

**2. Materials and methods.....** 67

**2.1. Materials .....** 67

**2.2. Methods .....** 67

**2.2.1. Spray-drying experiment .....** 67

**2.2.2. Determination of the drug content.....** 68

**2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction.....** 68

**2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM).....** 69

2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) .....	69
2.2.6. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) .....	69
2.2.7. In vitro drug release study .....	69
2.2.8. Electronic tongue (e-tongue) analysis .....	70
3. Results and discussion .....	71
3.1. Characteristics of taste-masked drug particles .....	71
3.2. Taste-masking evaluation by drug release study and e-tongue analysis .....	77
4. Conclusion .....	80
References .....	82

**Chapitre II : Optimiser le masquage de goût de l'acétaminophène par le caséinate de sodium et la lécithine à l'aide de plans d'expériences .....** 85

OPTIMIZING THE TASTE-MASKED FORMULATION OF ACETAMINOPHEN USING SODIUM CASEINATE AND LECITHIN BY EXPERIMENTAL DESIGN ..... 86

Abstract.....	86
1. Introduction .....	87
2. Materials and methods.....	88
2.1. Materials .....	88
2.2. Methods .....	89
2.2.1. Spray-drying experiment .....	89
2.2.2. Determination of the drug content.....	89
2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction.....	89
2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM) .....	89
2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC) .....	89
2.2.6. In vitro drug release measurements .....	90
2.2.7. HPLC analysis .....	90
2.2.8. Data analysis.....	90
3. Results and discussion .....	91
3.1. Assumed encapsulating mechanism .....	91
3.2. Screening study by a 2 <sup>4</sup> factorial design.....	91
3.2.1. Influence of inlet temperature (X <sub>1</sub> ), spray flow (X <sub>2</sub> ) and their optimal conditions... 94	
3.2.2. Influence of sodium caseinate amount (X <sub>3</sub> ), lecithin amount (X <sub>4</sub> ) and their interaction.....	95
3.3. Optimization by simplex design .....	96



3.3.1. Algorithm of simplex approach.....	96
3.3.2. Optimal formulation .....	96
4. Conclusion.....	99
References .....	100

**Chapitre III : Utilisation du caséinate de calcium en association avec la lécithine dans le masquage du goût de l'acétaminophène. Etude comparative avec le caséinate de sodium.....**

USE OF CALCIUM CASEINATE IN ASSOCIATION WITH LECITHIN FOR MASKING THE BITTERNESS OF ACETAMINOPHEN – COMPARATIVE STUDY WITH SODIUM CASEINATE.....	103
Abstract.....	103
1. Introduction .....	104
2. Materials and methods.....	105
2.1. Materials.....	105
2.2. Methods .....	106
2.2.1. Spray-drying experiment .....	106
2.2.2. Determination of the drug content.....	106
2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction.....	106
2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM) .....	106
2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC) .....	106
2.2.6. In vitro drug release measurements .....	107
2.2.7. HPLC analysis .....	107
2.2.8. Data analysis.....	107
3. Results and discussion.....	108
3.1. Use of calcium caseinate for masking the bitterness of acetaminophen .....	108
3.2. Comparative study between sodium caseinate and calcium caseinate .....	111
4. Conclusion.....	116
References .....	117

**Chapitre IV : Essai d'analyse de la « couche d'encapsulant » par la spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) .....**

1. Introduction .....	120
2. Matériels et méthodes.....	120

2.1. Echantillons .....	120
2.2. Principe de la technique ToF-SIMS .....	121
2.3. Conditions expérimentales .....	122
3. Résultats et discussion .....	123
3.1. Les spectres de masse de référence .....	123
3.2. La composition de l'extrême surface des particules de formulations prototypes .....	126
3.3 Le profil en profondeur .....	129
4. Conclusion .....	129
Références .....	130
Annexes .....	131

## **Chapitre V : Fabrication et caractérisation des minigranules à désintégration rapide**

.....	134
1. Introduction .....	135
2. Matériels et méthodes .....	136
2.1. Matières premières .....	136
2.2. Méthodes .....	136
2.2.1. Fabrication de minigranules .....	136
2.2.2. Perte à la dessiccation .....	137
2.2.3. Analyse granulométrique par tamisage .....	137
2.2.5. Rapport d'élongation .....	137
2.2.4. Friabilité .....	138
2.2.6. Détermination du temps de désintégration par analyseur de texture .....	138
2.2.7. Essai de dissolution .....	140
2.2.8. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	140
2.2.9. Porosimétrie par intrusion de mercure .....	140
2.2.10. Méthode d'adsorption gazeuse .....	141
3. Résultats et discussion .....	143
3.1. Minigranules neutres à base d'Avicel .....	143
3.2. Minigranules contenant du principe actif .....	146
4. Conclusion .....	151
Références .....	152
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES .....</b>	<b>154</b>


## LISTE DES ABREVIATIONS

Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
BPCA	Best Pharmaceutical for Children Act
CCP	Certificat Complémentaire de Protection
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CIC	Centres d'Investigations Cliniques
COP	Comité d'Orientation Pédiatrique
DEMEB	Direction de l'Evaluation des Médicaments et des produits Biologiques
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EMA ou EMA	European Medicines Agency
Enpr-EMA	European Network of Paediatric Research at the European Medicines Agency
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials
EudraPharm	European Union Drug Regulating Authorities Pharmaceutical Database
FDA	Food and Drug Administration
FDAMA	Food and Drug Administration Modernization Act
GRAS	Generally Recognized As Safe
GT-PIP	Groupe de Travail Pédiatrique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
Inserm	Institut national de la santé et de la recherche médicale
LEEM	Les entreprises du médicament
MEB	Microscopie électronique à balayage
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCA	Principal Component Analysis
PDCO	Paediatric Committee
PIP	Plan d'Investigation Pédiatrique
PmRN	Paediatric medicines Regulators Network
PREA	Pediatric Research Equity Act
PUMA	Paediatric-Use Marketing Authorization

RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
RCP	Réseau Clinique Pédiatrique
RH	Relative Humidity
RIPPS	Réseau d'Investigations Pédiatriques des Produits de Santé
RSD	Relative Standard Deviation
SEM	Scanning Electron Microscopy
SFP	Société Française de Pédiatrie
ToF-SIMS	Time of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	X-ray Diffraction

## LISTE DES FIGURES

Figure I-1:	Schematic illustration of continuous flow system for in vitro drug release study.....	70
Figure I-2:	Particle size distribution of spray-dried powders obtained from 1:0.5 taste-masked formulation (full line) and 5:1.5 taste-masked formulation (dashed line).....	71
Figure I-3:	SEM micrographs of spray-dried particles obtained from (a) 1:0.5 taste-masked formulation and (b) 5:1.5 taste-masked formulation.....	72
Figure I-4:	DSC thermographs of (a) pure drug; (b) 1:0.5 physical mixture and (c) spray-dried sample; (d) 5:1.5 physical mixture and (e) spray-dried sample.....	73
Figure I-5:	XRD patterns of (a) pure drug, (b) sodium caseinate, (c) 1:1 mixture and (d) 1:5 mixture.....	74
Figure I-6:	Deconvoluted C 1s XPS spectra for (a) acetaminophen, (b) 1:0.5 taste-masked formulation and (c) 5:1.5 taste-masked formulation.....	75
Figure I-7:	Chemical structure of (a) acetaminophen, (b) sodium caseinate, (c) lecithin.....	76
Figure I-8:	Drug release profiles as a function of time of the 1:0.5 and 5:1.5 taste-masked formulations in comparison to the pure drug studied by the continuous flow system.....	78
Figure I-9:	Radar plots of all sensor responses to active samples (in red) and corresponding placebo (in green) through the last three replicates obtained from (a) pure drug, (b) 1:0.5 taste-masked formulation and (c) 5:1.5 taste-masked formulation.....	79
Figure I-10:	Electronic tongue “taste map”: global signal comparison (PCA analysis of the electrode responses) between pure drug (reference) and taste-masked formulations.....	80
Figure II-1:	Schematic illustration of encapsulating mechanism via spray-drying.....	88
Figure II-2:	Half-normal probability plot of estimated effects.....	93
Figure II-3:	Response surface plot for the response Y as a function of inlet temperature and spray flow when the sodium caseinate amount ( $X_3$ ) and the lecithin amount ( $X_4$ ) are maintained at their middle level.....	94

Figure II-4:	Interaction plot between sodium caseinate amount and lecithin amount for the response Y as the inlet temperature and the spray flow are maintained at their middle level .....	95
Figure II-5:	Graphical illustration of simplex optimization of two variables from this study. The  -area represents the experimental domain investigated by factorial design (section 3.2). The simplex approach allows exploring the optimal conditions in the vicinity of the best conditions given by factorial design .....	96
Figure II-6:	SEM micrographs of spray-dried particles obtained by the optimal formulation.....	98
Figure II-7:	DSC patterns of (a) pure drug, (b) sodium caseinate, (c) lecithin and (d) spray-dried powder prepared under the optimal conditions .....	98
Figure II-8:	Drug release profiles as a function of time of pure drug, the Formulation O and the optimal formulation denoted O-4 studied by continuous flow system .....	99
Figure III-1:	Standardized Pareto chart of estimated effects for the response Y ( $X_1$ : Inlet temperature, $X_2$ : Spray flow, $X_3$ : Calcium caseinate amount and $X_4$ : Lecithin amount). The standardized effect is equal to the t-value of the Student's t-test and the reference line (dashed line) is drawn through the critical value at 5% significance level .....	109
Figure III-2:	Main effects plot of experimental variables for the response Y ( $X_1$ : Inlet temperature, $X_2$ : Spray flow, $X_3$ : Calcium caseinate amount and $X_4$ : Lecithin amount).....	110
Figure III-3:	Interaction plot between calcium caseinate amount and lecithin amount for the response Y.....	111
Figure III-4:	SEM micrographs of spray-dried formulations containing (a, b, c, d) sodium caseinate and (e, f, g, h) calcium caseinate prepared at the same conditions (inlet temperature 130°C, spray flow 300 L/h) and at different caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried i.e. (a, e) 1:0.5; (b, f) 5:0.5; (c, g) 1:1.5; (d, h) 5:1.5.....	112
Figure III-5:	DSC patterns of pure drug and spray-dried formulations containing (a) sodium caseinate and (b) calcium caseinate prepared at the same conditions (inlet temperature 130°C, spray flow 300 L/h) and at different	

	caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried i.e. 1:0.5, 5:0.5, 1:1.5; 5:1.5 .....	113
Figure III-6:	Drug release profiles of spray-dried formulations containing sodium caseinate (open symbol, full line) and calcium caseinate (closed symbol, dotted line) prepared at difference settings of inlet temperature (°C) and spray-flow (L/h), and at different caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried, i.e. (□,■) 1:0.5; (◇,◆) 5:0.5; (●,○) 1:1.5 and (△,▲) 5:1.5 .....	115
Figure IV-1:	Représentation de la structure moléculaire (a) de l'acétaminophène, (b) du caséinate de sodium et (c) de la lécithine.....	121
Figure IV-2:	Schéma du principe de ToF-SIMS. L'impact des ions primaires (A) produit l'émission des ions secondaires (B) qui font l'objet de l'analyse par l'analyseur de masse à temps de vol (D). Le tir d'électrons (C) a pour but de neutraliser la charge accumulée sur l'échantillon.....	122
Figure IV-3:	Principe du SIMS « dynamique » pour l'acquisition d'un profil en profondeur montrant l'alternance entre la courte impulsion des ions d'analyse, l'extraction des ions secondaires et l'impulsion plus longue des ions d'abrasion.....	122
Figure IV-4:	Spectrométrie de masse de l'acétaminophène en polarité (a) positive et (b) négative .....	123
Figure IV-5:	Spectrométrie de masse de la lécithine en polarité (a) positive et (b) négative .....	124
Figure IV-6:	Spectrométrie de masse du caséinate de sodium en polarité (a) positive et (b) négative .....	125
Figure IV-7:	Images ioniques par ToF-SIMS de formulations prototypes sur une zone de 500 x 500 µm .....	127
Figure V-1:	Représentation schématique de l'extrudeur à cylindres et du sphéronisateur .....	137
Figure V-2:	Installation expérimentale pour le test de détermination du temps de désintégration par analyseur de texture.....	138

Figure V-3:	Courbe distance-temps caractéristique des trois phases distinctes de désintégration à partir desquelles le point de début ( $t_1$ ) et le point de fin ( $t_2$ ) de désintégration peuvent être extrapolés .....	139
Figure V-4:	Phénomène d'adsorption physique d'un gaz sur un solide se produisant étape par étape en fonction de la pression relative ( $P/P_0$ ): adsorption des molécules de gaz isolées à la surface (étape 1), adsorption en monocouche (étape 2) et en multicouche (étape 3), condensation capillaire avec le remplissage des pores (étape 4) .....	141
Figure V-5:	Analyse granulométrique des minigranules d'Avicel obtenues par deux méthodes de dessiccation: lyophilisation (lyo) et séchage à l'étuve.....	143
Figure V-6:	Courbes distance-temps des minigranules d'Avicel PH 101 soumis à la force de compression en présence d'eau (courbe en rouge) et en absence d'eau (courbe en noir).....	145
Figure V-7:	Analyse granulométrique des minigranules contenant du principe actif (PA) .....	147
Figure V-8:	Observation des minigranules contenant du principe actif (PA) au stéréomicroscope .....	148
Figure V-9:	Profils de dissolution des minigranules contenant du principe actif (PA).	149
Figure V-10:	Distribution de taille des pores déterminée par les méthodes de l'intrusion de mercure ( $\diamond$ ) et de l'adsorption de l'azote ( $\circ$ ) .....	150
Figure V-11:	Images MEB de la surface (a) et de la section (b) de minigranules contenant 25% de principe actif .....	151



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Modifications chez l'enfant des facteurs impliqués dans l'étape d'absorption des médicaments administrés par voie orale.....	21
Tableau 2:	Corrélation entre la surface corporelle et le poids de l'enfant.....	23
Tableau 3:	Apports de liquide sur 24 heures en fonction du poids de l'enfant .....	24
Tableau 4:	Compartiments corporels en pourcentage du poids corporel en fonction de l'âge.....	25
Tableau 5:	Modification du métabolisme hépatique chez l'enfant.....	28
Tableau 6:	Modifications de l'excrétion rénale chez l'enfant .....	30
Tableau 7:	Matrice des voies d'administration et des formes galéniques versus les tranches d'âge de l'enfant .....	44
Tableau 8a:	Choix d'arômes en fonction de la saveur à masquer .....	46
Tableau 8b:	Préférences des arômes en fonction des indications thérapeutiques ciblées en Europe.....	46
Tableau 9:	Comparaison entre les édulcorants naturels, les polyols et les édulcorants de synthèse.....	47
Table I-1:	Feed dispersion composition in distilled water for spray-drying experiments .....	68
Table I-2:	Elemental composition for acetaminophen, sodium caseinate, lecithin, the 1:0.5 and 5:1.5 formulations .....	77
Table I-3:	Deconvolution of O 1s spectra for acetaminophen, sodium caseinate, lecithin, the 1:0.5 and 5:1.5 formulations .....	77
Table II-1:	Experimental levels of input variables.....	91
Table II-2:	Experimental conditions determined by 2 <sup>4</sup> -factorial design and the result data of 16 runs.....	92
Table II-3:	Experimental conditions determined by simplex design and the result data .....	97
Table III-1:	Properties of casein fractions .....	105
Table III-2:	Experimental levels of four input variables .....	108

Table III-3: Experimental conditions determined by 24-full factorial design and obtained results .....	108
Tableau IV-1: Composition des formulations prototypes. ....	120
Tableau V-1: Répartition granulométrique des matières premières (en $\mu\text{m}$ ).....	136
Tableau V-2: Caractéristiques des minigranules à base d'Avicel.....	145
Tableau V-3: Caractéristiques des minigranules contenant du principe actif (PA). ....	147

# **INTRODUCTION GENERALE**

## **Introduction**

Les spécialités pédiatriques sont peu développées. Pour de nombreux médicaments, l'absence de formes pédiatriques place les médecins et les pharmaciens face à un dilemme éthique. Il est souvent nécessaire de choisir le médicament et la dose pédiatrique à utiliser à partir des données disponibles pour l'adulte. Les présentations pédiatriques doivent souvent être préparées à partir de la forme destinée à l'adulte, avec déconditionnement. L'utilisation chez l'enfant de médicaments et de formes pharmaceutiques qui n'ont pas été testés en pédiatrie augmente le risque d'effets indésirables. En effet, l'enfant n'est pas un modèle réduit de l'adulte et les caractéristiques physiologiques des enfants varient avec l'âge et ne sont en aucun cas assimilables à celles des adultes. Les extrapolations et les adaptations de doses calculées à partir de posologies adultes sont une source d'erreur importante, conduisant à une augmentation potentielle des effets secondaires. Le métabolisme particulier chez les enfants nécessite des adaptations spécifiques en termes de formulation, de dosage et de système d'administration. Un médicament destiné à l'enfant nécessite une présentation galénique spécifique et adaptée à son âge, pour permettre une administration simple et sûre.

Face au manque de médicaments spécifiquement conçus et mis au point pour répondre aux besoins thérapeutiques de la population pédiatrique, les autorités françaises et européennes se sont vues dans l'obligation d'établir un cadre réglementaire visant à encourager le développement de médicaments à usage pédiatrique. Un nouveau règlement européen sur les médicaments pédiatriques est entré en vigueur en janvier 2007. Il prévoit la mise en place de mesures incitatives pour les laboratoires en faveur du développement de nouveaux médicaments pédiatriques. Les principaux objectifs visent à stimuler la mise au point de médicaments à usage pédiatrique, en renforçant la recherche, le développement et l'autorisation pour ce type de médicaments.

L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps devenue ANSM) s'est pleinement engagée dans le domaine des médicaments pédiatriques en se dotant d'une mission qui est devenue une cellule « médicaments pédiatriques » et d'un comité d'orientation pédiatrique. Ce comité a évalué les besoins en médicaments pédiatriques dans 9 domaines thérapeutiques, il a identifié les substances actives utilisées ou présentant un intérêt en pédiatrie. Cet état des lieux a servi de référentiel pour le travail d'évaluation des besoins en Europe mené par l'Agence européenne du médicament. Parmi ces besoins, il est

souvent cité l'absence de forme galénique adaptée ou l'amélioration nécessaire de la forme actuelle en raison d'une très mauvaise acceptabilité.

L'Académie nationale de Pharmacie a également travaillé sur le sujet et élaboré un rapport en juin 2005 avec certaines propositions, notamment:

- promouvoir et généraliser le développement de formes galéniques nouvelles spécifiquement adaptées à chaque âge de l'enfant, à savoir favoriser les formes buvables (sirops, solutions, suspensions, ...), favoriser les formes orales solides nouvelles (dispersibles, orodispersibles, ...), utiliser l'administration transdermique.
- mieux adapter la présentation de certaines spécialités existantes à chaque âge de l'enfant avec des dispositifs sécurisés d'administration comme dispositifs ou instruments de mesure de volume; mode d'expression de la concentration en substance active; bouchage de sécurité.

Parmi les formes à privilégier, se trouvent les formes destinées à la voie orale, solides ou liquides. Les formes liquides sont les plus adaptées aux jeunes patients en raison de leur facilité d'administration. L'absence de formes liquides adaptées à l'enfant peut amener à l'utilisation de formes injectables par voie orale. Cette pratique présente des risques thérapeutiques dus à la non-prise en compte du pH des solutions, de la présence d'éventuels excipients incompatibles avec la voie orale et de la biodisponibilité orale inconnue de ces solutions. Par contre, les formes liquides exigent comparativement aux formes sèches, des études de stabilité et de péremption plus approfondies. Etant donné la nature du milieu, la probabilité de dégradation de l'actif est augmentée et la contamination microbienne favorisée. Pour pallier à ces inconvénients, il est possible d'envisager des poudres ou granulés pour solution ou suspension, à reconstituer extemporanément.

Les formes solides offrent certains avantages tels qu'une stabilité et une maniabilité améliorée ainsi qu'une grande précision de dosage. Elles représentent également une alternative de formulation pour les principes actifs sensibles en milieu aqueux. De plus, la possibilité de réaliser un enrobage de la forme finale permet au goût de devenir un facteur moins critique. Cette capacité offre également l'opportunité de développer des formulations à libération modifiée, techniquement plus difficiles pour les formes liquides. Parmi les formes solides, il existe notamment les comprimés, souvent disponibles à des dosages non appropriés en pédiatrie et de taille non adaptée à l'enfant, et les gélules qui présentent l'avantage si elles ne sont pas gastro-résistantes de pouvoir être ouvertes et

mélangées à l'alimentation ou à un liquide pour en faciliter l'administration. Mais les formes orales solides posent le problème de l'acceptabilité et de l'évaluation de la palatabilité.

Quelle que soit la forme développée, le choix des excipients utilisés doit être fait avec une attention toute particulière. Certains excipients peuvent en effet ne pas être correctement métabolisés ou éliminés de manière analogue à ce qui est observé chez la population adulte et en devenir ainsi toxiques. Plusieurs guidelines européennes relatives à l'utilisation et à la toxicité éventuelle des excipients existent et peuvent servir de support.

### **Objectif du travail**

Dans ce contexte, notre travail présente deux axes de recherche concernant le développement et l'évaluation des médicaments à usage pédiatrique, qui sont (i) le masquage de goût pour une meilleure acceptabilité et (ii) la conception d'une forme pharmaceutique permettant la facilité d'administration et la flexibilité de dosage.

La première partie du manuscrit sera consacrée à une revue bibliographique sur l'ensemble des spécificités à prendre en considération lors du développement d'un médicament, en général, et d'une formulation, en particulier, destinés à l'enfant. Elle abordera la réglementation relative aux médicaments pédiatriques, les particularités des paramètres pharmacocinétiques en pédiatrie, la question de la palatabilité, les différents aspects de la formulation pédiatrique, notamment les formes galéniques et les excipients.

Les objectifs principaux de la partie expérimentale sont (i) de développer des techniques de masquage de goût d'un principe actif modèle, l'acétaminophène, (ii) de mettre au point des méthodes d'évaluation du masquage de goût et de caractérisation des particules obtenues, (iii) d'élaborer un procédé de fabrication d'une forme dispersible – des minigranules à désintégration rapide. Ainsi, les cinq chapitres de cette partie consisteront à traiter ces objectifs:

– Le Chapitre I s'attachera à développer le masquage de goût de l'acétaminophène réalisé par encapsulation via atomisation-séchage, en proposant l'utilisation d'excipients potentiellement tolérables et sans danger à l'égard de l'enfant, dont le caséinate de sodium et la lécithine. Nous détaillerons les techniques utilisées pour caractériser le produit obtenu,

en particulier, la mise au point de la méthode d'évaluation du masquage de goût incluant l'essai de libération du principe actif au moyen d'un système à flux continu.

– D'une façon raisonnée et planifiée, le Chapitre II se prêtera, en utilisant une méthodologie des plans d'expériences, à étudier le criblage des facteurs d'ordre des paramètres du procédé et de la formulation qui interviennent sur l'efficacité du masquage de goût. L'étude poursuivra ensuite l'optimisation de la formulation masquée à base du caséinate de sodium et de la lécithine à l'aide de la méthode simplex.

– Dans le Chapitre III, une nouvelle piste d'optimisation consistera à utiliser une autre forme de caséinate, le caséinate de calcium, en association avec la lécithine dans le but d'améliorer davantage l'efficacité du masquage de goût. Une étude de comparaison des deux types de caséinates utilisés sera également accordée.

– Nous envisagerons, dans le Chapitre IV, un essai d'analyse de la « couche d'encapsulant » par la spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) afin d'apporter un complément aux résultats énoncés dans le Chapitre I ainsi que d'élucider l'effet de l'association du caséinate de sodium et de la lécithine dans la formulation.

– Enfin, le Chapitre V présentera la faisabilité de produire une forme multiparticulaire à base de minigranules à désintégration rapide par une nouvelle approche, à savoir l'extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Les propriétés de ces minigranules seront caractérisées en vue d'évaluer leur application prometteuse comme une forme pharmaceutique pertinente à l'égard de l'usage pédiatrique.

Les chapitres se présenteront sous le format des publications avec une partie introductive, un détail des méthodes utilisées ainsi qu'une discussion et conclusion des résultats obtenus.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **1. Réglementation relative aux médicaments pédiatriques**

Pour améliorer l'offre de soins en matière de médicaments pour les enfants, une réglementation européenne relative aux médicaments à usage pédiatrique est entrée en vigueur le 26 janvier 2007. Cette réglementation prévoit de nouvelles obligations pour l'industrie pharmaceutique, assorties de récompenses et d'incitations [1].

### ***1.1. Historique***

La première initiative date de 1994 lorsque les Etats Unis mettent en œuvre la « Pediatric Labeling Rule » qui prévoyait que les fabricants de médicaments soumettent les données de la littérature existantes sur l'utilisation de leur médicament chez les enfants et déterminent si ces données sont suffisantes pour justifier des éléments spécifiques à l'enfant sur la notice du médicament, mais n'exigeait pas d'essais cliniques [2–4]. Cette démarche étant volontaire, elle a eu peu d'impact. Puis, la “Food and Drug Administration Modernization Act” (FDAMA) a introduit un processus en 1997, finalisé en 1998, dans lequel la FDA établissait une liste de principes actifs prioritaires pour lesquels des informations complémentaires en pédiatrie seraient bénéfiques, était d'accord sur la nécessité d'études et établissait un document écrit (Written Request) à compléter pour les études pédiatriques. Cela donnait une protection supplémentaire de 6 mois pour les laboratoires qui soumettaient des études répondant au Written Request. Cette réglementation est devenue le Pediatric Research Equity Act (PREA) en 2003. Ce texte prévoit l'obligation de fournir des données pédiatriques pour toute nouvelle demande d'AMM pour [5]:

- les produits protégés par un brevet,
- les produits biologiques et chimiques,
- l'indication pour laquelle est faite la demande d'AMM,
- tous les sous-groupes de la population pédiatrique.

Le PREA fut complété par le Best Pharmaceutical for Children Act (BPCA) en 2007 [6].

Parallèlement, en Europe, la Commission Européenne a organisé à l'Agence Européenne du Médicament une table ronde d'experts pour discuter de la médecine pédiatrique. Il a été conclu qu'un renforcement de la législation était nécessaire avec notamment l'introduction d'un système d'incitations [4], [7]. En 1998, la Commission a soutenu la nécessité d'une discussion internationale sur la performance des essais cliniques chez les enfants dans le contexte de l'ICH (International Conference on Harmonization) et une « guideline » a été

adoptée et fût finalisée en 2001 (ICH Topic E11: Note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population) [8].

La France a joué un rôle important et a pris l'initiative en juillet 2000 de présenter au Conseil des ministres de la santé de l'Union européenne un mémorandum exposant l'importance de développer des médicaments spécifiquement pour les enfants. Une résolution a été votée le 14 décembre 2000, invitant la Commission à s'emparer du sujet. Après un peu plus d'un an, la Commission a présenté le 28 février 2002 un document de consultation. Puis la Commission a déposé un projet de règlement le 5 novembre 2004, transmis au Conseil de l'Union européenne le 29 septembre 2004 dans le cadre de la procédure de co-décision. Le 1er juin 2006, le Parlement européen a donné son accord définitif au règlement concernant les médicaments pédiatriques qui entrera en vigueur en janvier 2007 [9].

Pour réaliser les missions décrites dans le règlement européen, l'Agence française nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a mis en place:

- une Cellule des Médicaments Pédiatriques au sein de la Direction de l'Évaluation des Médicaments et des produits Biologiques (DEMEB) qui coordonne les activités relatives aux médicaments pédiatriques et contribue à l'évaluation des PIP à l'EMEA,
- un Groupe de Travail Pédiatrique (GT-PIP) pluridisciplinaire pour l'évaluation des Plans d'Investigation Pédiatriques,
- un Comité d'Orientation Pédiatrique (COP) dont la mission principale est de contribuer au niveau national à la sécurité d'utilisation des médicaments chez l'enfant tout en favorisant l'amélioration des soins thérapeutiques.

### **1.2. Objectifs**

Le Règlement n°1901/2006 du Parlement Européen et du Conseil du 12 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique a pour principaux objectifs [10], [11]:

- de faciliter le développement et l'accès aux médicaments pour la population pédiatrique,
- d'assurer un haut degré de qualité quant à la recherche, l'évaluation et l'autorisation de mise sur le marché des médicaments à usage pédiatrique,
- d'améliorer la mise à disposition d'informations sur l'utilisation des médicaments chez l'enfant.

De plus, ces objectifs doivent être réalisés sans soumettre la population pédiatrique à des essais cliniques inutiles et sans retarder l'autorisation de médicaments destinés à d'autres tranches d'âge de la population.

Les champs d'application de ce règlement européen sont [6], [12]:

- les médicaments en développement,
- les médicaments déjà autorisés et couverts par des droits de brevet,
- et les médicaments déjà autorisés et non couverts par des droits de brevet.

Pour atteindre ces objectifs, le règlement a mis en place les mesures principales suivantes [6], [13], [14]:

- la création d'un Comité pédiatrique (Paediatric Committee ou PDCO) au sein de l'Agence Européenne du Médicament (EMA),
- l'obligation de soumettre un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP),
- la mise en place d'un système d'incitation et de récompenses,
- le développement d'un Réseau européen de Recherche en Pédiatrie,
- l'amélioration de l'accès du public à diverses informations sur les thérapeutiques en pédiatrie, avec mise en place de deux bases de données:
  - . Base européenne des essais cliniques en pédiatrie (EudraCT),
  - . Base des médicaments autorisés en pédiatrie en Europe (EudraPharm).

Pour aider au développement de médicaments pédiatriques, l'Agence Européenne du Médicament a rédigé un certain nombre de lignes directrices (guidelines) ou de notes explicatives comme par exemple:

- Note for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population (2001),
- Guideline on conduct of pharmacovigilance for medicines used by paediatric population (2006),
- Reflection paper: Formulation of choice for the paediatric population (2006),
- Note of explanation to accompany publication of reflection paper on formulations of choice for the paediatric population (EMA/CHMP/PEG/194810/2005),
- Guideline on conduct of pharmacovigilance for medicines used by the paediatric population (2007),
- Concept paper on the development of a quality guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use (2008).

Par ailleurs, en ce qui concerne la procédure de mise sur le marché de produits pharmaceutiques, les procédures instaurées par la législation pharmaceutique existante ne sont pas modifiées. Cependant, pour toute demande d'autorisation de mise sur le marché, les autorités compétentes vérifieront la conformité avec le Plan d'Investigation Pédiatrique approuvé ou la présence d'une dérogation ou d'un report y afférant [1]. Les justifications de dérogation ou report devront être explicitées dans le Plan.

### ***1.3. Le comité pédiatrique***

L'institution d'un comité pédiatrique au sein de l'Agence européenne des médicaments constitue l'élément clé du règlement européen. Ce comité pédiatrique est composé de [1], [11], [12]:

- 5 membres du « Committee for Medicinal Products for Human Use » (CHMP) et de leurs suppléants nommés par le CHMP,
- 1 expert et 1 suppléant désignés par chaque Etat membre (à l'exception des Etats membres déjà représentés dans les membres désignés par le CHMP),
- 3 membres et 3 suppléants qui représentent les professionnels de santé,
- 3 membres et 3 suppléants qui représentent les associations de patients,

Les membres sont nommés pour un mandat renouvelable de 3 ans.

L'expertise du comité couvre tous les domaines pertinents à savoir développement pharmaceutique, médecine pédiatrique, recherche clinique, pharmacologie, pharmacovigilance, éthique et santé publique [15]. Les missions du comité pédiatrique sont les suivantes [1], [11], [12]:

- évaluer et approuver les PIP et examiner les demandes de dérogation et de report qui afférent à ce PIP,
- fournir des avis sur la qualité, la sécurité et l'efficacité de médicament destiné à la population pédiatrique,
- formuler des conseils sur les questions liées aux médicaments pédiatriques,
- dresser un inventaire spécifique des besoins en médicaments pédiatriques et en assurer la mise à jour régulière. Pour cela, il est tenu compte [6], [16]:
  - . de la prévalence des affections dans la population pédiatrique et de leur gravité,
  - . de la disponibilité et de l'adéquation des traitements alternatifs (y compris de leur efficacité et de leurs effets indésirables),
  - . de toute question de sécurité propre à la pédiatrie,

- . des données émanant d'études réalisées dans des pays tiers.
- conseiller l'Agence et la Commission européenne en ce qui concerne la communication des mesures disponibles pour la réalisation de recherches sur les médicaments pédiatriques,
- adresser une recommandation à la Commission sur le choix du symbole appliqué sur le médicament utilisable chez l'enfant,
- assister et conseiller l'Agence en ce qui concerne l'établissement du réseau européen.

En accomplissant ces missions, le comité pédiatrique examinera les avantages thérapeutiques provenant des études sur des enfants en s'assurant que les études inutiles sont évitées. De même, il veillera à ce que l'autorisation de médicaments destinés à d'autres populations ne soit pas retardée en raison des exigences appliquées aux études sur les enfants [1].

#### ***1.4. Le Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP)***

La réglementation européenne impose aux laboratoires pharmaceutiques le dépôt d'un plan d'investigation pédiatrique auprès du comité européen pédiatrique [10], [17]:

- avant toute nouvelle demande d'AMM (médicaments en développement, article 7 du règlement),
- avant toute demande de modification d'AMM relative à une nouvelle indication, forme pharmaceutique ou voie d'administration (médicaments déjà autorisés, couverts par des droits et pour lesquels la firme demande un variation, article 8),
- lors d'une demande de PUMA (Paediatric Use Marketing Authorization) qui concerne les médicaments déjà autorisés mais n'étant plus couverts par des droits de brevet (ou Certificat Complémentaire de Protection) (article 30). La PUMA s'applique à une spécialité qui sera exclusivement développée pour l'enfant.

Par contre, il n'est pas nécessaire de déposer un plan d'investigation pédiatrique pour les génériques, les bio-similaires, les médicaments homéopathiques, les médicaments à base de plantes, et les médicaments autorisés selon la procédure de l'usage médical bien établi dont l'efficacité est largement prouvée sur la base de 10 années d'usage médical au sein de l'Union Européenne [13], [17].

Le PIP est défini à l'article 2 du règlement comme un programme de recherche et de développement visant à garantir que sont collectées les données nécessaires pour déterminer les conditions dans lesquelles un médicament peut être autorisé pour le

traitement de la population pédiatrique [1]. C'est pourquoi, il est nécessaire de présenter les plans d'investigation pédiatriques à un stade précoce du développement du produit afin que les études cliniques pédiatriques puissent être conduites en temps opportun avant le dépôt des demandes d'autorisation sur le marché. Il est d'ailleurs précisé à l'article 16 du règlement que le PIP, ou la demande de dérogation, accompagné d'une demande d'approbation du PIP, doivent être présentés au plus tard à la fin des études de pharmacocinétiques dans la population adulte.

Après réception de la demande, l'agence européenne des médicaments (EMA) dispose de 30 jours pour en vérifier la validité et la transmettre au comité pédiatrique qui nomme un rapporteur et dispose d'un délai de 60 jours pour approuver la demande ou proposer une modification du PIP (le délai étant alors prolongé de 60 jours supplémentaires). Ensuite, l'EMA transmet dans les 10 jours l'avis du comité pédiatrique au demandeur qui dispose alors de 30 jours pour contester l'avis auprès de l'EMA. Le comité pédiatrique a dès lors un nouveau délai de 30 jours pour revoir ou confirmer son avis. L'avis devient définitif si aucune demande de révision n'est introduite dans les 30 jours suivant la réception de l'avis du comité pédiatrique ou si celui-ci rejette ou adjuge la demande de révision. L'EMA prend une décision finale concernant le PIP dans les 10 jours qui suivent l'avis définitif [11], [13].

Le PIP doit contenir un calendrier détaillé et décrire les mesures proposées pour démontrer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament sur la population pédiatrique ainsi que les mesures envisagées pour adapter la formulation galénique en vue d'améliorer sa sécurité, efficacité, acceptabilité, ou son usage [1], [11], [12]. Toutes les tranches d'âge définies par la Guideline ICH E 11 sont concernées [5], [12].

Tous les médicaments développés n'étant pas adaptés ou nécessaires aux enfants, un système de dérogations a été instauré pour éviter les expérimentations inutiles sur la population pédiatrique. Il est précisé à l'article 11 du règlement, trois cas dans lesquels une dérogation est possible [5], [11], [13]:

- lorsque le médicament n'est probablement pas efficace ou sûr pour la population pédiatrique,
- lorsque le médicament ne présente pas d'intérêt chez l'enfant (indication spécifique à l'adulte comme la ménopause, la maladie d'Alzheimer, ...),

– lorsque le médicament n’apporte pas de bénéfice significatif par rapport aux traitements existants.

Les dérogations par classes thérapeutiques sont publiées par le comité pédiatrique européen sur le site de l’agence européenne du médicament.

Un système de report a également été mis en place. Les demandes de report doivent être justifiées par des motifs scientifiques et techniques ou par des raisons liées à la santé publique, et l’article 20 du règlement pédiatrique précise qu’un report est accordé [11], [18]:

- lorsqu’il est approprié de mener des études sur l’adulte avant d’entamer des études sur la population pédiatrique,
- lorsque la réalisation d’études sur la population pédiatrique prend plus de temps que la conduite d’études sur des adultes.

Le report peut être fondé sur d’autres motifs scientifiques et techniques: lorsque des données non cliniques supplémentaires sont jugées nécessaires, ou lorsque de graves problèmes de qualité empêchent actuellement le développement de la/des formulation(s) pertinente(s).

Il est nécessaire d’obtenir l’agrément sur un plan de développement dans toutes les tranches d’âge concernées avant de pouvoir déposer une Autorisation de Mise sur le Marché [19]. Lorsque toutes les mesures figurant dans le PIP auront été réalisées, il en sera fait mention dans l’autorisation de mise sur le marché [1].

### ***1.5. Procédures d’autorisation de mise sur le marché***

Les procédures existantes d’autorisation de mise sur le marché ne sont pas modifiées mais, dans le cas de médicaments nouveaux et de médicaments autorisés protégés par un brevet, les autorités compétentes doivent vérifier la conformité avec le PIP approuvé. L’évaluation de la qualité, de la sécurité, de l’efficacité des médicaments pédiatriques et la délivrance des autorisations de mise sur le marché restent du ressort des autorités compétentes considérant [11], [20].

L’autorisation de mise sur le marché en vue d’un usage pédiatrique ou PUMA (Paediatric Use Marketing Authorization) est un nouveau type d’autorisation de mise sur le marché pour les médicaments déjà autorisés mais n’étant plus couverts par des droits de brevet (ou Certificat Complémentaire de Protection) et qui seront développés exclusivement pour les

enfants. L'application de la PUMA est une démarche volontaire. Le développement de ce médicament chez les enfants suivra le PIP préalablement déposé. La PUMA couvrira l'indication et la formulation appropriées à la population pédiatrique et comprendra les données relatives à l'usage du produit au sein de la population pédiatrique, collectées conformément au PIP approuvé [11].

Les points clés de la PUMA sont résumés ci-dessous [20]:

- le médicament est développé exclusivement pour la population pédiatrique,
- la procédure centralisée est applicable (accès automatique),
- le dossier d'application doit inclure les données nécessaires pour établir la qualité, la sécurité et l'efficacité dans la population pédiatrique, y compris les données spécifiques éventuellement requises pour justifier le dosage, la forme pharmaceutique ou la voie d'administration appropriée du produit,
- les données peuvent faire référence à des données pertinentes dans le dossier d'un médicament qui est ou a été autorisé dans la Communauté européenne,
- la PUMA bénéficie d'incitations et de récompenses, notamment en ce qui concerne la protection réglementaire des données et le nom du produit.

Pour la PUMA, les procédures d'autorisation possibles sont la procédure centralisée, la procédure de reconnaissance mutuelle et la procédure nationale.

### ***1.6. Récompenses et incitations***

Outre les nouvelles obligations pour l'industrie pharmaceutique, le règlement européen prévoit un système de récompenses et incitations pour l'industriel qui développe des médicaments pédiatriques. Ces récompenses diffèrent selon la catégorie de médicaments concernés [1], [11], [13], [14]:

- *pour les médicaments nouveaux et pour les médicaments autorisés et couverts par un brevet ou un certificat complémentaire de protection (CCP):* 6 mois de prolongation du CCP sont accordés lorsque les études pédiatriques ont été finalisées, dans le cas où: (i) toutes les mesures prévues dans le PIP approuvé sont respectées, (ii) le médicament est autorisé dans tous les pays membres, et (iii) des indications pertinentes sur les résultats des études sont incluses dans les informations relatives au produit (RCP);
- *pour les médicaments qui ne sont plus couverts par un brevet:* il s'agit d'un médicament qui fait l'objet d'une nouvelle AMM en vue d'un usage pédiatrique (PUMA). Il pourra bénéficier d'une nouvelle période d'exclusivité de 10 ans. De plus, il est possible d'utiliser



la même dénomination commerciale pour le médicament pédiatrique que celle attribuée au médicament (de référence) autorisé chez les adultes

– *pour les médicaments orphelins*: 2 ans d'exclusivité de marché sont ajoutés soit 12 ans au lieu de 10 ans si les prescriptions concernant les données relatives à l'usage pédiatrique sont intégralement respectées.

### ***1.7. Développement d'un Réseau Européen de Recherche en Pédiatrie***

L'article 44 du règlement européen prévoit la création d'un réseau européen d'investigation clinique en pédiatrie dont l'objectif est de coordonner les études portant sur les médicaments pédiatriques, et de réunir les compétences scientifiques et administratives, afin d'éviter des études inutiles sur la population pédiatrique [5], [11]. Ce réseau s'appuiera sur les structures nationales déjà existantes, et sur les différents réseaux de centres d'essais cliniques [14].

En ce qui concerne les structures nationales, en France il existe un réseau, le RIPPS (Réseau d'Investigations Pédiatriques des Produits de Santé), créé en 2005 sous l'égide de l'Inserm et de la Société Française de Pédiatrie pour faciliter la réalisation d'essais cliniques au niveau national et garantir la qualité des essais [21], [22]. Ce réseau s'inscrit dans une structure plus large de recherche clinique, le réseau national RCP (Réseau Clinique Pédiatrique) [21]. Dans son organisation, le réseau RIPPS s'appuie sur les compétences et les structures existantes, notamment:

- le réseau des CIC (Centres d'Investigations Cliniques) pédiatriques,
- les réseaux spécialisés dans les différentes pathologies (comme la mucoviscidose ou la neurologie pédiatrique),
- les réseaux de ville.

La gouvernance du RIPPS est assurée par [22]:

- une cellule logistique,
- un comité d'orientation stratégique composé de représentants des différentes structures du réseau, des organismes partenaires et de tutelle (Inserm, SFP, LEEM, ANSM...) chargé de développer, d'animer le réseau, d'établir un plan stratégique et de vérifier la réalisation des objectifs,
- un conseil scientifique international qui a pour mission de donner son avis sur la stratégie et le bilan de l'activité du RIPPS.

Ce réseau fait partie du réseau européen Enpr-EMA (European Network of Paediatric Research at the European Medicines Agency), coordonné par l'EMA dans le cadre du Règlement européen sur les médicaments. La création du réseau européen Enpr-EMA fait suite à une série de discussions à l'agence européenne du médicament en 2005 et 2006 entre les représentants des différents réseaux des Etats membres. Le conseil d'administration de l'agence européenne du médicament a ensuite adopté la stratégie de mise en œuvre du réseau Enpr-EMA le 15 janvier 2008 [23]. Un premier workshop s'est alors tenu en février 2009 pour discuter de la mise en place de ce réseau, et 38 réseaux et/ou centres d'investigations cliniques ont été retenus [5], [24]. Deux groupes de travail ont alors été créés pour organiser le réseau selon la stratégie développée et définir les critères nécessaires pour adhérer au futur réseau. En mars 2010, un second workshop s'est tenu à l'agence européenne pour discuter des propositions élaborées par les deux groupes de travail et pour établir un accord sur la structure et les critères d'appartenance à l'Enpr-EMA [5], [25]. Les principaux objectifs du réseau Enpr-EMA sont de:

- favoriser une recherche éthique, de haute qualité, sur les médicaments à usage pédiatrique,
- permettre la collaboration entre les réseaux et les intervenants,
- coordonner les études relatives aux médicaments à usage pédiatrique et éviter les essais inutiles chez les enfants,
- mettre en place des compétences scientifiques et administratives au niveau européen,
- aider au recrutement de patients pour les essais cliniques,
- promouvoir les applications du programme cadre de la Commission européenne.

Le réseau européen Enpr-EMA ne réalise pas d'essais cliniques ou de financement d'études, et ne décide pas non plus des domaines de recherche pédiatrique car c'est la responsabilité des Etats membres, de la Commission Européenne ou de chaque réseau individuel national. L'agence européenne du médicament est responsable pour garantir la collaboration au sein du réseau. Ces objectifs ont été présentés aux intervenants en mars 2011 lors d'un troisième workshop au cours duquel le réseau Enpr-EMA a été officiellement lancé [26]. A ce jour, 34 réseaux et centres ont soumis des rapports d'autoévaluation indiquant s'ils répondent ou non aux critères minimaux requis. Les critères d'appartenance retenus sont au nombre de six [27]:

- l'expérience et la capacité en recherche clinique,
- la structure et l'organisation du réseau,

- les compétences scientifiques,
- le management de la qualité mis en place,
- les programmes de formation offerts,
- la prise en compte des patients, parents et associations de malades.

Le centre opérationnel du réseau est un groupe de coordination qui est responsable de la stratégie du réseau à court terme et à long terme. Ses tâches principales sont de [27]:

- faciliter l'accès de l'industrie pharmaceutique aux centres de recherche clinique pédiatrique et aux experts,
- identifier les nouveaux réseaux à inclure dans l'Enpr-EMA,
- développer des outils d'éducation pour les enfants et les parents afin d'accroître leur volonté de prendre part à des essais cliniques,
- agir comme un forum de communication,
- discuter et résoudre les questions opérationnelles et scientifiques,
- assurer la liaison avec le comité pédiatrique de l'agence européenne (PDCO) qui est le comité scientifique du réseau.

L'Enpr-EMA travaille en collaboration étroite avec des partenaires internationaux, notamment:

- l'OMS par le biais du PmRN (Paediatric medicines Regulators Network), réseau des autorités pharmaceutiques en charge des médicaments pédiatriques mis en place par l'OMS en 2010 et auquel appartient l'Agence Européenne des Médicaments.
- la FDA (Food and Drug Administration) des Etats Unis avec laquelle elle partage des informations sur les questions scientifiques et éthiques liées au développement de médicaments pédiatriques afin de favoriser les plans de développement mondiaux.

### ***1.8. Particularités des essais cliniques pédiatriques***

Les essais cliniques sont difficiles à mener chez les enfants notamment en raison de difficultés éthiques, techniques et logistiques. En effet, se posent souvent des questions sur l'éthique, le recrutement/consentement, le rapport bénéfices/risques, le prélèvement d'échantillons (volumes, nombre, ...), les formes galéniques inadaptées, scolarité des enfants, disponibilité des parents, horaires, etc.

Pour la réalisation d'un essai clinique, un protocole est rédigé qui renseigne en détail tous les aspects de la recherche. On y trouve en particulier l'argumentaire qui doit convaincre

de l'utilité de l'essai, les objectifs de l'essai, les critères d'évaluation (principal, secondaires), le type d'essai (phase 1, 2 ou 3), le plan expérimental qui montre de façon très détaillée comment va être concrètement réalisé l'essai avec la méthodologie, la population étudiée, l'effectifs, les examens pratiqués, les risques et les contraintes pour les volontaires, etc. [28].

Dans un premier temps, il y a un processus d'évaluation par les autorités de santé de l'essai clinique pédiatrique à partir du protocole, qui comprend plusieurs étapes [29]:

- Evaluation éthique du protocole, réalisée par un Comité d'Ethique pour s'assurer que l'essai clinique chez l'enfant ne peut être évité.
- Expertise supplémentaire, parfois, nécessité de faire intervenir des experts en formulation, en pharmacologie pédiatrique, des pédiatres, etc.
- Documents pertinents à fournir à l'évaluateur de l'essai clinique et aux experts.

En plus du protocole, il faut fournir un formulaire de consentement éclairé, la dernière brochure de l'investigateur et l'information sur le produit approuvée par une autorité réglementaire.

- Inspections: des inspections de Bonnes Pratiques Cliniques peuvent être appropriées étant donné la vulnérabilité de la population concernée,
- Recherche bibliographique: pour s'assurer que toutes les données pertinentes ont été fournies par l'investigateur, l'évaluateur effectue une recherche bibliographique.

Dans un deuxième temps, le résultat du processus d'évaluation de l'essai clinique pédiatrique par les autorités doit donner des conclusions claires quant à son acceptabilité sur deux points essentiels : l'aspect scientifique et le respect de l'éthique. Pour cela, il y a trois points principaux auxquels il faut répondre [29]:

**1/ Est-ce que l'essai pédiatrique est nécessaire ?**

- . Est-ce que l'essai est basé sur une question scientifique bien identifiée relevant du domaine pédiatrique ?
- . L'étude pourrait-elle être réalisée chez l'adulte ou chez des sujets moins vulnérables que l'enfant ?
- . Est-ce que l'essai pédiatrique répond aux besoins de la population pédiatrique dans laquelle il va être mis en place ?

2/ Est-ce que l'essai pédiatrique respecte les règles éthiques en particulier celles applicables aux enfants ?

- . Est-ce que le Comité d'Ethique a émis un avis favorable à l'essai ?
- . Est-ce que l'essai répond aux principales règles éthiques, à savoir:
  - Respect des participants et de leur autonomie ?
  - Répartition équitable du médicament ?
  - Les bénéfices et risques ont-ils été évalués chez l'enfant ?
  - Y a-t-il un bénéfice direct pour l'enfant ?
  - Est-ce que le protocole requiert la publication rapide des résultats (et la communication aux participants) même en cas de résultats négatifs ?

3/ Est-ce que l'essai est scientifiquement acceptable ?

- . Est-ce que la méthodologie est acceptable ?
- . Est-ce que l'essai est capable de répondre à l'objet du protocole ?
- . Est-ce que l'essai va être réalisé et suivi selon les Bonnes Pratiques Cliniques, par exemple avec une qualité suffisante ?

Le détail des éléments à inclure dans le protocole est décrit dans des textes officiels comme les lignes directrices de l'ICH [8] ou les recommandations de l'OMS [29].

Il est important de bien prendre en compte les spécificités pédiatriques dans les essais cliniques pédiatriques, à savoir [28]:

- Les tranches d'âge concernées par le traitement doivent être toutes représentées dans l'essai si la pathologie les concerne toutes.
- L'acceptabilité par les enfants (prévention de la douleur, le nombre d'actes pratiqués et leur lourdeur...).
- Le confort du petit patient et sa qualité de vie doivent être préservés au maximum. Aussi, il est important de bien décrire tous les actes pratiqués, le nombre de prélèvements mais aussi la quantité de sang qui ne doit généralement pas dépasser 5% du volume total chez les enfants toutes les deux semaines.
- La faisabilité pratique: il y a la scolarité de l'enfant mais aussi la disponibilité des parents, l'encadrement, les horaires, les régimes dont l'impact pour les familles peut être différent d'une maladie à l'autre.
- L'essai ne peut se faire sans l'information et le recueil du consentement éclairé signé des parents mais aussi de l'assentiment de l'enfant. Si la notice d'information écrite

destinée à l'enfant n'est pas obligatoire juridiquement, elle est recommandée dès l'âge du primaire. Elle doit bien sûr être adaptée à la compréhension de l'enfant sans provoquer chez lui un stress supplémentaire. Si l'enfant refuse d'entrer dans l'étude, le médecin ne peut pas l'inclure.

## **2. Particularités des paramètres pharmacocinétiques en pédiatrie**

L'enfant est un organisme en maturation, loin d'être simplement un « modèle réduit » de l'adulte. L'administration d'un médicament à l'enfant nécessite de garder en mémoire l'importante variabilité et les changements constants en termes de pharmacocinétique que subit l'organisme dans cette période de vie.

### ***2.1. Définition et classification de la population pédiatrique***

La population pédiatrique est très hétérogène. Le terme « enfant » est un terme générique qui recouvre des individus totalement différents d'un point de vue de l'âge et du poids. Selon la recommandation ICH E 11 relative à l'investigation clinique des médicaments au sein de la population pédiatrique [8], la population pédiatrique peut se classer par catégories de tranches d'âge basées sur les paramètres physiologiques et les caractères communs existant à l'intérieur de chaque tranche d'âge:

- . Nouveau-né prématuré (moins de 37 semaines de gestation),
- . Nouveau-né à terme : de 0 à 27 jours,
- . Nourrisson : de 1 à 23 mois,
- . Enfant (au sens strict) : de 2 à 11 ans,
- . Adolescent : de 12 à 16 ou 18 ans en fonction des pays.

### ***2.2. Particularités de l'absorption***

Les évolutions physiologiques que subit l'enfant lors du développement entraînent une modification des différents facteurs qui influencent l'absorption et ce pour les différentes voies d'administration des médicaments.

#### ***2.2.1. Voie orale***

L'absorption gastro-intestinale est conditionnée par différents facteurs tels que la mobilité gastro-intestinale, le pH gastrique, l'état de maturation de la muqueuse intestinale, la présence de nourriture, etc., qui évoluent de façon différente avec l'âge (Tableau 1).

**Tableau 1:** Modifications chez l'enfant des facteurs impliqués dans l'étape d'absorption des médicaments administrés par voie orale.

Facteur	Modifications
pH gastrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Hypochlorhydrie relative pendant les 10 – 15 premiers jours</li> <li>. Valeur adulte atteinte vers l'âge de 2 ans</li> </ul>
Vitesse de vidange gastrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Ralentissement lors des 6 premiers mois</li> <li>. Valeur adulte atteinte vers 6 – 8 mois</li> </ul>
Vitesse d'absorption intestinale	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Ralentissement</li> </ul>
Péristaltisme intestinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Ralentissement</li> </ul>
Fonction biliaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Réduction de la vitesse de synthèse et du volume du pool des acides biliaires</li> </ul>
Colonisation bactérienne et l'intestin	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Variable</li> </ul>

Chez le nouveau-né, à la naissance, le pH gastrique est neutre entre 6 à 8. La sécrétion acide augmente en quelques heures et le pH diminue pour atteindre des valeurs entre 1,5 et 3. Il apparaît ensuite que le pH évolue dans les jours qui suivent vers une augmentation qui serait maximale entre le 10<sup>e</sup> et 30<sup>e</sup> jour de vie. Enfin, le niveau de sécrétion d'acide gastrique n'atteint celui de l'adulte que vers l'âge de 2 à 3 ans [30–32].

La vidange gastrique est diminuée chez le nouveau-né (demi-vie de vidange gastrique égale à 90 minutes) en comparaison avec l'adulte (demi-vie de vidange gastrique de 60 minutes). Elle augmente progressivement avec l'âge pour atteindre les valeurs de l'adulte entre le 6<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> mois de vie [33]. Il faut souligner qu'elle est encore plus diminuée chez le prématuré. La vidange gastrique est aussi modifiée par certains facteurs extérieurs à la maturation de l'enfant comme le type d'alimentation et certaines situations pathologiques.

L'hypochlorhydrie et la diminution de la vitesse de vidange gastrique chez le nouveau-né ont toutefois peu de conséquences car l'absorption a lieu essentiellement au niveau de l'intestin.

Il semble que ce soit la vitesse d'absorption intestinale qui soit diminuée pour de nombreux principes actifs. La vitesse d'absorption intestinale augmente avec l'âge et atteint les valeurs de l'adulte au-delà de la période néonatale. Cette diminution de la vitesse

d'absorption intestinale laisse prévoir, surtout pour les principes actifs à demi-vie courte, une diminution de leur concentration maximale ainsi qu'un retard du temps d'obtention de cette concentration [33]. Le péristaltisme intestinal est également ralenti, irrégulier et dépend partiellement du régime alimentaire. L'immaturation d'autres fonctions physiologiques est susceptible d'avoir une influence sur l'absorption intestinale des médicaments:

- l'immaturation relative de la muqueuse intestinale,
- le fonctionnement incomplet de la fonction biliaire, avec une réduction de la vitesse de synthèse et du volume du pool des acides biliaires,
- la colonisation de la flore bactérienne, qui dépend de l'âge gestationnel, du mode d'accouchement et du type d'alimentation.

A ces modifications physiologiques au cours de la maturation viennent s'ajouter des phénomènes pathologiques susceptibles de modifier l'absorption des médicaments (sténose du pylore, résection étendue de l'intestin grêle, malnutrition, ...).

### **2.2.2. Voie rectale**

La vitesse d'absorption est particulièrement dépendante de la forme galénique, elle est généralement très grande dans le cas d'une forme de solution, beaucoup plus que la forme de suppositoire. L'absorption est très efficace [34] et peu influencée par l'âge [11], [31], aucune influence de la maturation sur l'absorption par cette voie n'a été mise en évidence. Ainsi, l'administration des médicaments à l'enfant par voie rectale est utile, en particulier, dans certaines situations d'urgence comme dans le traitement de la crise convulsive, en cas de refus de la voie orale ou en cas de vomissements.

### **2.2.3. Voie cutanée**

L'absorption percutanée est plus importante chez le nouveau-né et le nourrisson que chez l'adulte. La moindre épaisseur de la couche cornée de l'épiderme est l'une des explications qui ont été avancées. Cependant, à l'exception du nouveau-né prématuré, il a été montré qu'elle n'est pas plus fine chez l'enfant que chez l'adulte, la maturation et l'épaisseur étant assez rapides (environ 8 semaines). Le taux d'hydratation de la couche cornée plus important et le rapport élevé entre la surface cutanée et le poids de l'enfant expliquent mieux ce phénomène. L'augmentation de l'hydratation de la couche cornée joue en effet un rôle particulièrement important pour les médicaments appliqués sur le siège, les couches et les changes jouant le rôle d'un véritable pansement occlusif. Le facteur le plus



important est le rapport de la surface cutanée au poids corporel, beaucoup plus élevé chez l'enfant que chez l'adulte (Tableau 2).

**Tableau 2: Corrélation entre la surface corporelle et le poids de l'enfant [35].**

Age	Poids (kg)	Surface corporelle (x 10 <sup>3</sup> cm <sup>2</sup> )	Ration surface/poids (cm <sup>2</sup> /kg)	Comparaison (adulte = 1)
Nouveau-né	3,4	2,1	617,6	2,4
6 mois	7,5	3,5	466,7	1,8
1 an	9,3	4,1	440,9	1,7
4 ans	15,5	6,5	419,4	1,6
10 ans	30,5	10,5	344,3	1,3
adulte	70	18,1	258,6	1

L'absorption percutanée variant avec l'âge, cette voie est peu utilisée de façon fiable en thérapeutique. La forte absorption percutanée explique des manifestations cliniques de surdosage après application cutanée de glucocorticoïdes (hypertension intracrânienne, ralentissement de la croissance), de pansements alcoolisés (coma éthylique), de produits iodés (hypothyroïdie), de vaseline salicylée, de camphre, d'hexachlorophène, de mercure. A l'origine de ces intoxications, se trouvent des facteurs de risque ou un mésusage, tels que l'application de trop grandes quantités sur une surface relativement importante, un pansement occlusif ou une répétition abusive des applications. Le manque d'informations spécifiquement pédiatriques concernant la posologie de ces médicaments favorise les erreurs.

#### **2.2.4. Voie intramusculaire**

L'absorption au niveau musculaire est dépendante du flux sanguin de la masse musculaire, de la surface de diffusion de la solution *in situ*, et de la facilité de pénétration au travers de la paroi endothéliale des capillaires.

Chez le nouveau-né, en particulier, le taux et l'efficacité de l'absorption sont réduits et aléatoires en raison à la fois de la faiblesse des masses musculaires, de leur faible motilité comparativement à l'adulte, d'un débit sanguin musculaire relativement faible pendant les premiers jours de vie (qui peut varier ensuite de façon considérable au cours de la maturation et dans diverses situations pathologiques), de l'efficacité relative des contractions musculaires nécessaires à la diffusion de la solution injectée, et de l'importance du pourcentage d'eau dans la masse musculaire. Aussi, le nouveau-né

présente une instabilité vasomotrice extrême qui entraîne une vasoconstriction réflexe exagérée [31].

Cette voie qui, en plus du caractère douloureux de l'injection, présente des risques de rétraction musculaire, de lésion du nerf sciatique pour les injections au niveau de la fesse, étant à éviter dans la mesure du possible chez le prématuré et le nouveau-né.

### **2.2.5. Voie intraveineuse**

La voie intraveineuse ne possède pas de spécificités propres à la pédiatrie, cependant cette voie pose des difficultés techniques en relation avec l'invasivité et la douleur de l'acte. D'autre part, le volume à injecter ne doit pas dépasser une limite. Le volume maximal journalier est en relation avec l'âge et le poids de l'enfant (Tableau 3). Le volume et les électrolytes apportés lors de la perfusion ou de l'injection intraveineuse peuvent altérer l'équilibre hydrique de façon critique.

**Tableau 3: Apports de liquide sur 24 heures en fonction du poids de l'enfant [36].**

Poids	Volume maximal par 24 heures
moins de 3 kg (nouveau-né)	. 150 mL/kg en commençant par 40 – 60 mL/kg pour le nouveau-né en dose de charge)
3 – 10 kg	. 100 mL/kg
11 – 20 kg	. 1000 mL plus 50 mL/kg par kg supplémentaire dans la tranche 11 – 20 kg
plus de 20 kg	. 1500 mL plus 20 mL/kg par kg supplémentaire au-dessus des 20 kg
adulte	. 2000 mL pour une femme et 2500 mL pour un homme
besoin sodique	. approximativement 3 mmol/kg/jour

### **2.3. Particularités de la distribution**

Une fois absorbé dans la circulation sanguine générale, le médicament est distribué à travers les différents liquides et tissus de l'organisme. La vitesse d'action, l'intensité et la durée des effets pharmacologiques du médicament dépendent non seulement des taux et des vitesses auxquels il est absorbé et éliminé, mais également de la cinétique de la distribution. Le degré et le taux de distribution du principe actif dépendent des propriétés physicochimiques de la molécule, du pH des liquides physiologiques, du volume des

compartiments de l'organisme, du débit sanguin au niveau de chaque organe et tissu, de la proportion d'eau extracellulaire, de la masse de tissu adipeux, de la perméabilité des membranes et de l'importance de la liaison aux protéines plasmatiques.

Au cours de la maturation, les facteurs entrant en jeu dans le processus de distribution du médicament dans l'organisme subissent eux aussi d'importantes modifications [30], [37].

Le Tableau 4 présente les compartiments corporels en fonction de l'âge. Chez le nouveau-né, le volume d'eau corporel est plus grand, l'eau totale de l'organisme représentant environ 75% du poids corporel (85% chez le prématuré); elle diminue avec l'âge pour atteindre la valeur de l'adulte (60%) vers un an. Chez le nouveau-né et le nourrisson, le pourcentage d'eau extracellulaire est plus élevé que chez l'adulte: l'eau extracellulaire représente environ 45% du poids du corps du nouveau-né, elle diminue avec l'âge pour atteindre 25% à un an et 15 – 20% à la puberté. L'eau intracellulaire, calculée par différence, représente 33% du poids du corps du nouveau-né, elle augmente au cours de la première année et se stabilise à 40% [38].

**Tableau 4:** Compartiments corporels en pourcentage du poids corporel en fonction de l'âge [38].

Age	Compartiment corporel (%)				
	1 jour	1 mois	1 an	10 ans	25 ans
Eau intracellulaire	33	35	35	35	42
Eau extracellulaire	45	38	25	15	20
Plasma	4	4	4	4	4
Masse grasseuse	15	18	25	18	20

Le compartiment adipeux est lui plus réduit que chez l'adulte. Il représentant environ 15% du poids du nouveau-né (1% chez le prématuré) augmente jusqu'à 25% vers un an et diminue ensuite pour représenter environ 10% du poids du corps vers 4 ans, puis atteint 18% vers 10 – 11 ans.

La masse des muscles striés du squelette ne représente que 20 – 25% du poids corporel total chez le nouveau-né. Au contraire, les poids du foie et du cerveau sont comparativement supérieurs. Le cerveau contient moins de myélines et le débit sanguin cérébral est plus élevé que chez l'adulte. La barrière hémato-encéphalique est fonctionnellement immature à la naissance, les médicaments diffusent facilement dans le liquide céphalo-rachidien et le système nerveux central. L'acidose augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, le système nerveux central du

nouveau-né, à un moindre degré chez le nourrisson, a une sensibilité particulière avec un risque accru de toxicité neurologique et de convulsions.

La liaison aux protéines des médicaments est modifiée chez le nouveau-né dans le sens d'une augmentation de la fraction libre. L'ampleur de cette augmentation dépend à la fois des propriétés physicochimiques du principe actif et des conditions physiopathologiques, à savoir:

- une concentration réduite en albumine et en globulines plasmatiques. La concentration en albumine plasmatique est diminuée chez le nouveau-né, mais elle l'est davantage encore chez le prématuré. Elle augmente avec l'âge pour atteindre la valeur de l'adulte vers un an. La concentration de l' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide suit une évolution comparable au cours de la première année de vie. Il a été montré qu'une baisse de la concentration de l'albumine s'accompagne d'une augmentation de la fraction libre d'un acide faible et celle de l' $\alpha$ -1-glycoprotéine d'une augmentation de la fraction libre d'une base faible;
- la persistance d'albumine fœtale, qui présente une affinité plus faible pour les principes actifs, a été avancée pour expliquer en partie l'augmentation de la fraction libre mais son rôle est controversé;
- la concentration plasmatique élevée des acides gras non estérifiés chez le nouveau-né. En effet, ils se lient de façon réversible à l'albumine et peuvent ainsi augmenter la fraction libre des médicaments liés à cette protéine. Toutefois, les concentrations qui entraînent *in vitro* une diminution de la liaison des principes actifs à l'albumine sont rarement atteintes chez le nouveau-né et le rôle de ce mécanisme n'est pas démontré;
- l'hyper-bilirubinémie observée en période néonatale. La bilirubine peut en effet déplacer le principe actif de son site de liaison à l'albumine. En cas d'hyper-bilirubinémie, il y a un risque: soit de surdosage du principe actif (affinité plus faible de la molécule que celle de la bilirubine), soit d'ictère à bilirubine libre.

La liaison aux protéines plasmatiques plus faible chez le jeune enfant que chez l'adulte, associée à des différences dans les divers compartiments corporels, peut avoir des conséquences variables qualitativement et quantitativement sur la distribution des médicaments dans les divers organes. L'augmentation de la fraction libre peut entraîner des rapports tissu/plasma différents de ceux observés chez l'adulte. Ceci a pour conséquence un risque plus élevé d'augmentation des effets pharmacodynamiques à concentrations plasmatiques apparemment analogues.

#### ***2.4. Particularités du métabolisme***

Dans la grande majorité des cas, les principes actifs sont liposoluble et seront transformés, au niveau du foie essentiellement, en métabolites hydrosolubles, moins toxiques, d'excrétion facile [30], [31].

La première étape du métabolisme est la captation dépendante de la protéine Y ou ligandine, protéine basique qui se lie également à la bilirubine et aux anions organiques. Elle est présente au niveau des hépatocytes, des cellules tubulaires proximales et des cellules muqueuses intestinales.

Chez le fœtus et le nouveau-né, la concentration de la protéine Y est faible et atteint le niveau adulte dans les 5 – 10 jours de vie postnatale. Cela laisse prévoir que la clairance hépatique des principes actifs dont le coefficient d'extraction est faible sera plus faible chez le nouveau-né que chez l'enfant plus âgé [31].

Les différents systèmes métaboliques responsables de la transformation des médicaments se développent à des vitesses variables et n'atteignent pas leur stade de maturation au même moment (Tableau 5). Certains arrivent à maturité chez le nourrisson, alors que d'autres n'y arrivent que plus tard, parfois seulement à la puberté; la maturation est cependant généralement atteinte à l'âge de 6 mois [30]. Toutefois, la plupart des systèmes enzymatiques responsables du métabolisme des médicaments (microsomes hépatiques, estérases plasmatiques et tissulaires) sont présents à la naissance, mais leur activité est faible. Au cours de l'enfance, le poids relatif du foie change et l'activité de certaines enzymes varie également avec l'âge. Il y a également, comme chez l'adulte, beaucoup de variabilité entre les patients de même âge.

Les réactions de phase I et de phase II sont le plus souvent diminuées chez le jeune enfant. L'activité métabolique réduite chez le nouveau-né résulte de plusieurs paramètres concourants: la diminution du cytochrome P450, la diminution de la NADPH cytochrome C réductase, la présence d'inhibiteurs endogènes d'origine maternelle, la réduction du flux sanguin hépatique et l'hypoxémie relative. Il apparaît que le métabolisme des médicaments chez le nouveau-né a lieu à une vitesse plusieurs fois inférieure à celle observé chez l'adulte. Cette situation se maintient pendant les 2 – 3 premières semaines de vie extra-utérine, puis survient ensuite une augmentation spectaculaire des réactions de phase I. En 5 – 6 jours, on peut passer d'une situation où la clairance est de 1/5 à 1/10 des valeurs

adultes à une situation où la clairance pourra être 5 fois supérieure à ces mêmes valeurs adultes. Ce changement soudain peut avoir des implications thérapeutiques extrêmement importantes parce qu'on passe d'une situation où il y a un risque de surdosage à une situation de risque de sous-dosage.

**Tableau 5: Modification du métabolisme hépatique chez l'enfant.**

Facteur	Modifications au cours du développement de l'enfant
Clairance métabolique globale	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Diminution pendant les 2 – 3 premières semaines</li> <li>. Rapide augmentation (2 – 6 fois les valeurs de l'adulte à 2 – 3 ans)</li> <li>. Diminution progressive jusqu'à atteindre la valeur adulte vers 9 – 10 ans</li> </ul>
Activité des enzymes impliquées dans les réactions de phase I	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Forte réduction chez les prématurés</li> <li>. Réduction de 50% de l'activité de l'adulte chez le nouveau-né à terme, pendant les premiers jours</li> <li>. Augmentation jusqu'à atteindre l'activité de l'adulte vers 10 – 11 ans</li> </ul>
Activité des enzymes impliquées dans les réactions de phase II	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Sulfo-conjugaison et glycy-conjugaison normales à la naissance</li> <li>. Glucurono-conjugaison et acétylation, diminuées à la naissance, atteinte de l'activité de l'adulte vers 24 – 30 mois</li> </ul>

Concernant les cytochromes P450, certains apparaissent très tôt après la naissance: c'est le cas du cytochrome 2D6 et 2E1 dont le contenu hépatique augmente rapidement après la 24<sup>e</sup> heure de vie, indépendamment de l'âge gestationnel [39], [40]. Les iso-enzymes de la sous-famille de cytochromes 2C apparaissent un peu plus tardivement dans les semaines qui suivent la naissance [41]. Le cytochrome 1A2 se développe encore plus tardivement dans les mois qui suivent la naissance [42]. Le profil ontogénique de la sous-famille de cytochromes 3A est très particulier. En effet, le contenu hépatique en cytochromes 3A varie au cours du développement du stade fœtal à l'âge adulte. Cependant, il existe plusieurs iso-formes. Dans le foie fœtal, l'iso-forme prédominante est le cytochrome 3A7, alors que chez l'adulte le cytochrome 3A7 est absent et remplacé par le cytochrome 3A4. Ce remplacement s'effectue dans les premières semaines de vie [43].

L'activité des estérases est elle aussi réduite à la naissance; elle est intimement liée à l'état de développement et plus faible chez le prématuré que chez le nouveau-né à terme [31].

Les réactions de phase II sont inégalement diminuées à la naissance. La glycy-conjugaison et la sulfo-conjugaison sont matures dès la naissance, alors que le glucurono-conjugaison est réduite de façon significative; les valeurs trouvées chez l'adulte ne sont atteintes qu'à l'âge de 24 – 30 mois. L'acétylation devient fonctionnelle au cours de la croissance et à différents stades selon le médicament [44], [45].

Le fait que certaines réactions du métabolisme soient matures au fur et à mesure dès la naissance explique que le métabolisme se fasse selon des voies préférentielles selon l'âge [44], [46]. La variabilité interindividuelle est très importante et dépend du développement physique et de la génétique, mais aussi de l'exposition à des inducteurs enzymatiques xénobiotiques *in utero* auxquels la mère a été exposée ou pendant les premiers jours de vie extra-utérine [30].

### **2.5. Particularités de l'élimination**

L'élimination des médicaments et de leurs métabolites est assurée par diverses voies d'excrétion comme la voie urinaire, biliaire et pulmonaire. L'excrétion rénale est la principale voie impliquant trois mécanismes: la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire, qui ne sont pas matures à la naissance (Tableau 6) [30], [31], [47].

A la naissance, la fonction rénale est réduite dans son ensemble. Le rein est anatomiquement et fonctionnellement immature. La fonction glomérulaire est plus avancée que la fonction tubulaire, et ce déséquilibre persiste jusqu'au sixième mois [31]. Le développement de la fonction rénale dépend de l'âge gestationnel ainsi que des changements hémodynamiques séquentiels intervenant dans les premiers jours de vie. La maturation complète des fonctions glomérulaire et tubulaire n'est achevée qu'à l'âge de 6 – 8 mois.

La filtration glomérulaire, mesurée par la clairance de la créatinine, est diminuée chez le nouveau-né. Elle augmente ensuite avec le développement de la fonction rénale et l'accroissement de l'irrigation rénale: l'augmentation est importante au cours des 2 – 3 premiers jours de vie, atteint les valeurs adultes à la fin de la deuxième semaine et demeure constante pendant l'enfance et l'adolescence. La maturation de la fonction glomérulaire

dépend plus de l'âge post-natal que de l'âge gestationnel: à un âge post-natal égal, le prématuré se comporte à peu près de la même façon que l'enfant à terme [30].

**Tableau 6: Modifications de l'excrétion rénale chez l'enfant.**

Facteur	Modifications au cours du développement de l'enfant
Fonction rénale	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Diminution à la naissance</li> <li>. Fonction glomérulaire plus avancée que la fonction tubulaire jusqu'au sixième mois</li> <li>. Maturation complète vers 6 – 8 mois</li> </ul>
Filtration glomérulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Diminution à la naissance</li> <li>. Augmentation importante au cours des 2 – 3 premiers jours</li> <li>. Valeur adulte atteinte vers le 15<sup>ème</sup> jour</li> </ul>
Réabsorption tubulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Pas de différence en fonction de l'âge</li> </ul>
Sécrétion tubulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Diminution à la naissance</li> <li>. Valeur adulte atteinte vers 2 mois</li> </ul>

La limitation de la fonction glomérulaire lors des deux premières semaines de vie a une influence significative sur l'élimination des médicaments qui dépend de la filtration glomérulaire. Cependant, l'insuffisance de cette fonction peut être partiellement compensée par un pH urinaire plus acide, par la réduction de la réabsorption tubulaire des composés faiblement basiques ou pour les molécules ayant une affinité pour les protéines du filtrat urinaire. Au contraire, la réabsorption des composés acides peut être favorisée en raison de l'acidité du pH urinaire.

La réabsorption tubulaire passive n'a pas été démontrée différente en fonction de l'âge. Mais on sait qu'elle est fonction de la liposolubilité du produit, donc plus importante pour les produits non métabolisés, et fonction de l'ionisation du produit, donc du pH urinaire. Les différences en fonction de l'âge dépendent ainsi de la maturation des mécanismes extrarénaux comme le degré de transformation en métabolites hydrosolubles et l'acidité de l'urine. Cette dernière favorise la réabsorption des acides organiques faibles aux dépens de celle des bases organiques faibles.



La sécrétion tubulaire, mesurée par la clairance de l'acide p-aminohippurique (PAH), est diminuée chez le nouveau-né; la maturation de cette fonction est plus lente. Elle n'atteint les valeurs de l'adulte qu'au cours du deuxième mois.

### **3. Formulation pédiatrique**

La galénique doit permettre de formuler des spécialités adaptées à la population pédiatrique si particulière. Le véritable défi vient du fait que les informations disponibles sur l'acceptabilité des différentes formes galéniques existantes (comme taille, goût, ...), sur la tolérance et la sécurité des excipients employés en fonction de l'âge et du stade de développement de l'enfant sont encore très limitées [48].

#### ***3.1. Facteurs influençant le choix de la voie d'administration***

Le choix de la voie d'administration est en effet influencé et même parfois, conditionné par certains facteurs tels que:

##### ***a. Capacité à utiliser les différentes formes galéniques***

Cette capacité est essentiellement liée à l'âge et plus précisément au stade de développement physique (coordination des gestes, ...) et intellectuel (compréhension) [48]. La problématique majeure demeure dans la délimitation du seuil d'âge à partir duquel il est considéré qu'un enfant peut avaler une forme solide (comprimé, gélule, ...) en toute sécurité [48]. D'après [49], l'âge moyen de 6 ans est défini pour cela, même s'il est toujours indispensable de prendre en compte et d'évaluer l'état de santé du patient; des différences inter-individuelles étant perpétuellement présentes. La voie orale demande également certaines exigences concernant les caractéristiques de la forme pharmaceutique comme le goût, l'odeur ou encore la texture, facteurs essentiels pour l'acceptabilité et l'adhérence au traitement thérapeutique des jeunes enfants. Le cas particulier des comprimés buccaux ou sublinguaux nécessite en plus, de la part de l'enfant, une capacité à conserver le médicament sur son site d'absorption. Enfin, toute voie sollicitant des administrations répétées est à éviter du fait du caractère inconfortable et du stress potentiel provoqué par chaque prise du médicament.

##### ***b. Type de pathologie (aiguë ou chronique)***

En cas de pathologie aiguë, associée fréquemment à une douleur ou une fièvre, les jeunes patients peuvent être effrayés et par conséquent, se montrer moins coopératifs. Les formes liquides, même si elles présentent l'inconvénient de pouvoir être recrachées, sont

alors préférées pour écarter tout risque de débat et d'étouffement. Dans le cas d'intoxication ou de toute autre pathologie présentant des vomissements dans le tableau clinique, les voies d'administration rectale et parentérale se voient imposées [48].

Les jeunes patients atteints de pathologie chronique nécessitant des traitement continus, doivent être formés dès leur plus jeune âge (vers 3 – 5 ans) à l'administration de formes solides [48], [50]. Des injections régulières peuvent être tolérées à conditions que des techniques appropriées de distraction de la douleur soient mises en place. Dans tous les cas, il est préférable d'offrir une large gamme de formes galéniques, afin que les patients ainsi que les donneurs de soins aient le choix pour que l'observance sur une longue durée soit respectée.

#### ***c. Facilité d'administration par les donneurs de soins***

Bien que la préférence de l'enfant envers une forme galénique soit importante, il est également utile de prendre en compte le degré de facilité d'administration éprouvé par les donneurs de soins, à savoir parents, infirmiers, instituteurs, etc. La voie rectale est un exemple simple de voie d'administration pouvant ne pas très être appréciée et par conséquent, poser problème dans certaines situations. Des formes pharmaceutiques pertinentes peuvent faciliter l'administration de médicaments.

#### ***d. Comportements liés à l'adolescence***

L'adolescence est une période particulière du développement où des comportements tels que la rébellion ou la recherche de la discrétion vis-à-vis de l'environnement peuvent s'installer. C'est également la catégorie de la population parmi laquelle l'inobservance est la plus élevée [50]. Il est donc essentiel de prendre en considération ces facteurs de changements lors du développement de médicaments destinés à cette population spécifique.

#### ***e. Handicaps physique ou mental***

Les patients souffrant d'handicaps sévères sont, dans la majorité, incapables de prendre en charge leur médication. Certains nécessitent l'administration des médicaments par sonde parentérale, les produits doivent alors se présenter sous forme liquide dans le meilleur des cas. Les interactions avec l'alimentation parentérale et les systèmes d'administration (matériau tubulaire, ...) sont capitales à prendre en compte. Ces patients peuvent être

également incapables de se manifester et d'exprimer leur douleurs, leur inconfort, leurs préférences ou encore de décrire les effets indésirables d'un médicament.

#### ***f. Milieu culturel***

C'est effectivement dans le cas de préférence du goût que des différences culturelles peuvent influencer le choix des arômes. Il peut également exister des différences de tolérance envers les différentes voies d'administration suivant les pays d'Europe et les différentes régions.

### ***3.2. Formes galéniques***

Le détail suivant ne constitue pas une liste exhaustive des différentes formes galéniques mais les formes sont énumérées en fonction des voies d'administration utilisées.

#### ***3.2.1. Voie orale***

L'administration des médicaments par voie orale est le cas le plus rencontré chez l'enfant [51], ainsi de nombreuses formes galéniques existent. Pour les formes orales, la palatabilité constitue un paramètre critique qui conditionne l'acceptabilité chez l'enfant.

##### ***3.2.1.1. Formes liquides***

###### ***a. Solutions***

Les solutions sont obtenues par une mise en solution et dissolution du ou des principes actifs en phase aqueuse [52]. Cette forme n'est applicable qu'aux principes actifs solubles et présentant des caractéristiques de goût favorables.

###### ***b. Sirops***

Les sirops sont des préparations aqueuses sucrées et de consistance visqueuse. Ils sont généralement préparés avec du saccharose qui, à une concentration voisine de 65%, leur donne la consistance, assure une conservation bactériologique sous certaines conditions et permet également de masquer le goût indésirable de certains principes actifs [51], [52]. Le saccharose, considéré comme excipient à effet notoire, peut être substitué par du glucose, du fructose, du sucre inverti ou d'autres sucres. Les polyols de saveur sucrée (comme glycérol, sorbitol, xylitol) ainsi que les édulcorants artificiels et des épaississants peuvent également être employés afin d'obtenir des sirops « sans sucre ».

### ***c. Suspensions***

Les suspensions sont classiquement préparées lorsque le principe actif ne peut être dissous dans l'eau ou lorsque le principe actif possède des caractéristiques de goût défavorables [50]. Les suspensions permettent également, vis-à-vis des solutions, un dosage en principe actif plus important, ce qui contribue à réduire le volume d'administration. Une libération modifiée, par enrobage des particules, peut être aussi obtenue. Lors de l'utilisation, les suspensions nécessitent d'être correctement agitées afin de garantir la conformité et l'homogénéité du dosage [53].

### ***d. Emulsions***

Les émulsions de type lipophile/hydrophile sont préparées par dispersion d'une phase huileuse dans une phase aqueuse en ajoutant un agent émulsifiant [52].

Les formes liquides représentent les formes les plus adaptées aux enfants en bas âge (de la naissance jusqu'à l'âge de 6 – 8 ans) pour lesquels un risque de « fausse route » est avéré lors de l'administration d'un comprimé ou d'une gélule [54], [55]. La facilité d'administration représente leur principal avantage [56]. Les formes liquides ne posent pas de problème de désintégration ou de dissolution (notamment pour les solutions), ce qui se caractérise par une biodisponibilité *in vivo* plus élevée comparativement aux formes sèches [51], [55].

Les formes liquides permettent une bonne adaptation de dose en fonction de l'âge et du poids par un simple calcul du volume à administrer selon la concentration en principe actif [53], [56]. Le volume administré par unité de prise constitue, avec le goût, un des paramètres clés dans l'acceptabilité de ces formes. La concentration du principe actif doit être déterminée et ajustée au mieux pour répondre à des exigences en termes de volume acceptable: les volumes ciblés sont de l'ordre de 5 mL pour les nourrissons et les jeunes enfants (jusqu'à 5 ans) et de 10 mL pour les enfants plus âgés [48], [49].

Etant donnée la nature du milieu liquide, ces formes galéniques présentent des problèmes de stabilité concernant la dégradation du principe actif et la contamination microbienne. Elles nécessitent, dans la plupart des cas, l'addition de conservateurs antimicrobiens, d'antioxydants ou d'agents tampons qui sont potentiellement toxiques [48], [53], [54]. Pour pallier à ce besoin, l'utilisation de préparations liquides unidoses est parfois privilégiée [51].

Une particularité des formes liquides est, dans la majorité des cas, de nécessiter de dispositifs pour administration qui sont indispensables pour un dosage précis [48]:

- Les cuillères fournies par le fabricant sont les plus classiques, par exemple des cuillères-mesures ou des gobelets-doseurs. Leur précision est limitée: seuls les médicaments à marge thérapeutique relativement large, nécessitant des posologies de l'ordre de 5 à 15 mL, peuvent être dosés par ce genre de système [51].
- Les pipettes graduées et les seringues orales, par leur plus grande précision, sont mieux adaptées à une utilisation chez les jeunes enfants, en permettant un contrôle de l'administration mais également en autorisant l'administration de principes actifs à marge thérapeutique étroite.
- Dans le cas de l'administration de faibles volumes, l'utilisation de compte-gouttes est privilégiée. La précision du dosage dépend de la tenue du dispositif par l'utilisateur ainsi que des propriétés de la formulation telles que la densité et la viscosité du liquide [57].

### **3.2.1.2. Formes solides**

Les formes solides présentent certains avantages tels qu'une stabilité et une maniabilité améliorées ainsi qu'une grande précision de dosage comparativement aux formes liquides. Elles offrent également les possibilités de réaliser un enrobage de la forme finale permettant le masquage d'un goût indésirable et, de développer des formulations à libération modifiée techniquement plus difficiles pour les formes liquides [58]. L'inconvénient majeur réside cependant dans l'acceptabilité chez l'enfant en bas âge en raison des difficultés à avaler les formes solides (dysphagie) [50].

#### **a. Comprimés**

Les comprimés classiques sont souvent inappropriés à un usage pédiatrique en raison de leur dosage et de leur taille [51]. Les mini-comprimés sont préférés et peuvent permettre une adaptation du dosage. Le développement de comprimés pluri-sécables peut être considéré même si leur conception est parfois difficile [49].

#### **b. Gélules**

Les gélules sont généralement constituées de poudres ou de granulés, contenus à l'intérieur de capsules. Elles représentent l'avantage, si elles ne sont pas gastro-résistantes, de pouvoir être ouvertes et mélangées à l'alimentation ou à un liquide pour en faciliter l'administration [51].

***c. Formes effervescentes***

Les formes effervescentes incluent les comprimés, les poudres et les granulés qui se dissolvent préalablement dans de l'eau avant administration. Elles s'approprient les avantages des formes sèches tout en palliant leurs inconvénients. Toutefois, la dissolution peut requérir des volumes non négligeables, ce qui est problématique pour l'administration chez les plus jeunes enfants [51].

***d. Microgranules***

Les microgranules constituent un axe de développement majeur pour les formes pédiatriques. Ils présentent les avantages d'être faciles à administrer mais également de permettre un ajustement précis du dosage en fonction de l'âge et du poids de l'enfant, couvrant ainsi une large catégorie de patients [48], [49], [59].

***e. Formes orodispersibles***

Les formes orodispersibles comprennent les comprimés orodispersibles, les lyophilisats et les fins films qui se placent dans la bouche où ils se dissolvent ou fondent rapidement sur la langue. Elles offrent les avantages d'être faciles à administrer en évitant le risque de fausse route ou de crachat de la dose. Contrairement à d'autres formes sèches classiques, le goût représente un paramètre de formulation critique de ces formes [48], [49], [59].

***3.2.2. Voie buccale et sublinguale***

Etant donné le temps de séjour, parfois long, dans la cavité buccale, le goût représente incontestablement un facteur déterminant pour l'acceptabilité des formes galéniques administrées par la voie buccale et sublinguale. Ces formes, différant des formes orales classiques, sont destinées à rester en contact avec la muqueuse buccale, sans être avalées lors de l'administration. Elles possèdent l'avantage d'éviter l'effet de premier passage hépatique. L'applicabilité de ces formes à la population pédiatrique nécessite une évaluation d'un point de vue de sécurité d'administration et d'observance, qui vont dépendre essentiellement de l'âge des patients [49].

***a. Comprimés buccaux ou sublinguaux***

Les comprimés buccaux ou sublinguaux sont destinés à être administrés dans la cavité buccale en vue d'une action locale ou systémique. Peu de principes actifs peuvent être formulés avec succès par ces formes galéniques à cause des problèmes de goût et

d'irritation locale. L'utilisation de ces formes chez les jeunes enfants n'est pas bien adaptée en raison de problèmes de sécurité et d'observance.

#### ***b. Préparations muco-adhésives***

Les préparations muco-adhésives sont destinées à être maintenues au sein de la cavité orale par adhérence à l'épithélium de la muqueuse et peuvent être absorbées au niveau systémique. Une administration chez les jeunes enfants, de 4 à 6 ans, peut être considérée.

#### ***c. Pastilles***

Les pastilles sont des formes galéniques solides dures destinées à être sucées, qui se dissolvent ou se désintègrent progressivement dans la cavité buccale. Elles sont souvent utilisées pour administrer des principes actifs à effet local (au niveau de la bouche ou du pharynx) mais peuvent également être dispensées pour une absorption systémique. Les pastilles présentent une forme adaptée pour les enfants de plus de 6 ans pour éviter le risque de fausse route.

#### ***d. Gommages à mâcher***

Les gommages à mâcher médicamenteuses sont des préparations solides destinées à être mâchées, sans être avalées. Les gommages doivent avoir une désintégration rapide, être moelleuse et contenir idéalement des édulcorants non cariogènes. Elles libèrent le principe actif dans la salive durant la mastication et peuvent être utilisées aussi bien à visée locale que systémique. Elles constituent une forme pédiatrique attractive pour les enfants de 6 ans et plus [60].

#### ***e. Préparations liquides (sprays, gouttes)***

Elles peuvent se présenter sous forme de solutions, d'émulsions ou de suspensions dans le but d'un traitement local ou systémique. Ces formes sont administrées par instillation ou pulvérisation à l'intérieur de la cavité buccale ou sur une partie spécifique. Le recours à ces formes nécessite une évaluation au cas par cas pour chaque enfant (aurélie 53).

### ***3.2.3. Voie nasale***

De nombreux principes actifs, administrés par voie nasale, sont destinés à une action locale au niveau de la muqueuse nasale et des tissus sous-jacents. La voie nasale peut permettre également d'accéder directement à la circulation systémique. Elle offre une alternative attractive à des voies d'administration plus invasives [49], [61], [62]. Néanmoins, l'administration nasale peut présenter des inconvénients tels que des effets systémiques

non recherchés, des irritations de la muqueuse ou des douleurs ainsi qu'une baisse de l'efficacité du traitement en cas de sécrétions abondantes.

**a. Gouttes nasales**

Les gouttes nasales assurent l'instillation à l'intérieur de la cavité nasale et sont habituellement présentées en conditionnement multidoses dotés d'un dispositif d'administration. Ces formes peuvent être applicables aux petits enfants de 1 – 2 ans.

**b. Préparations pour pulvérisation nasale (sprays)**

Les préparations pour pulvérisation nasale sont constituées par des solutions, des émulsions ou des suspensions conditionnées dans différents systèmes de dispensation, mécanique ou pressurisé (aérosols). Leur inconvénient majeur est l'impact de la bouffée sur la muqueuse nasale. Il peut en résulter une irritation locale et une diminution de la surface d'absorption du médicament. L'acceptabilité et l'observance de ces formes chez les jeunes enfants requièrent une étude au cas par cas.

**c. Poudres nasales**

Les poudres sont dispersées au moyen de systèmes d'administration appropriés, permettant à l'aide d'une pression, d'envoyer la poudre dans la narine. Ces formes galéniques s'adaptent particulièrement aux exigences des formulations pédiatriques.

**3.2.4. Voie rectale**

La voie rectale peut être utilisée pour obtenir un effet local ou systémique. Elle peut être indiquée dans certaines situations:

- La voie orale est contre-indiquée ou non applicable en cas de nausées ou de vomissements, d'obstruction de la partie haute du système gastro-intestinal, d'état d'inconscience ou pose en continu d'une sonde nasogastrique;
- Les formes orales sont rejetées à cause de la palatabilité;
- Si on a besoin d'effets systémiques immédiats tels que dans le cas des crises convulsives (diazépam en solution rectale);
- Lorsqu'un effet local est recherché comme laxatif (bisacodyl ou glycérol) ou anti-inflammatoire (sulphasalazine ou prédnisolone).

La voie rectale peut se présenter comme une réelle alternative aux autres voies d'administration invasives. Cependant, l'administration par voie rectale aux patients pédiatriques peut avoir un risque de rejet ou d'expulsion précoce. L'observance de cette



voie peut être très limitée par rapport à la voie orale, le plus souvent à cause d'habitudes culturelles [49–51], [58].

#### ***a. Suppositoires***

Les suppositoires représentent les formes rectales les plus communes. Leur taille doit être adaptée à l'âge des patients: les suppositoires destinés aux nourrissons ne doivent pas excéder 1 g [49]. Le sectionnement des suppositoires est difficile et ne garantit pas l'exactitude de la dose administrée. La disponibilité de plusieurs dosages pour les différentes catégories d'âge est donc nécessaire. Les excipients utilisés ne doivent pas entraîner l'irritation des muqueuses concernées.

#### ***b. Lavements***

Le volume des lavements doit être corrélé avec l'effet recherché (local ou systémique) ainsi que l'âge du patient. Les volumes des lavements pour des traitements à visée systémique doivent être le plus faible possible afin d'obtenir la délivrance de la dose et l'absence d'irritation. Le dispositif d'administration de la forme rectale doit être simple d'utilisation et ne pas blesser le tube rectal.

#### ***c. Gels***

La forme gel est souvent mieux tolérée que la forme liquide et possède une biodisponibilité plus régulière et plus rapide que la forme suppositoire.

#### ***d. Pommades***

Elles sont utilisées pour un traitement local.

### ***3.2.5. Voie cutanée***

La voie cutanée se caractérise par une plus grande perméabilité des substances actives chez la population pédiatrique en raison d'un taux d'hydratation de la couche cornée plus important et d'un rapport surface corporel/poids plus élevé comparativement à l'adulte [35], [49]. La biodisponibilité de cette voie est fortement dépendante des paramètres physiologiques tels que l'âge et la nature de la peau, la localisation d'administration ainsi que les caractéristiques du véhicule utilisé. La rationalité des doses à administrer par voie cutanée, permettant d'atteindre une balance bénéfique/risque acceptable, constitue une des contraintes majeures de ces formes galéniques.

### ***a. Topiques***

Chez les patients pédiatriques âgés de moins de 2 ans, la zone d'application doit être restreinte. Une exposition systémique de 2 à 10 fois supérieure à celle observée chez l'adulte a été démontrée dans le cas de corticoïdes. Les véhicules lipophiles tels que ceux rencontrés dans les formulations à base de paraffine ainsi que les dispositifs imperméables, type pansement occlusif ou patch, contribuent à augmenter l'exposition systémique. La fièvre ou l'apport extérieur de chaleur peuvent également accroître la perméabilité des principes actifs administrés par cette voie.

### ***b. Dispositifs transdermiques***

Les dispositifs transdermiques délivrent le principe actif pendant plusieurs heures voire plusieurs jours dans la circulation systémique, permettant des cinétiques de libération prolongée avec une diminution des effets secondaires. Ces systèmes d'administration sont associés à une grande observance de la part des patients et peuvent répondre à un certain nombre de critères de choix pour la population pédiatrique. Lorsque la voie cutanée est requise, les dispositifs transdermiques sont préférés aux topiques classiques de par leur caractère d'administration plus reproductible et standardisé [51].

Il est cependant peu probable qu'une seule formulation transdermique puisse couvrir et s'adapter aux différentes propriétés de la peau durant les phases de maturation chez l'enfant. Bien que la majorité des matrices transdermiques puisse être découpée pour ajuster le dosage, le développement de dispositifs spécialement conçus pour ces patients est préféré. Les dispositifs types membranes ne doivent pas être divisés en raison du risque d'altération de la libération du médicament.

Un des inconvénients des dispositifs transdermiques est son retrait. Leur taille doit prendre en compte l'âge de l'enfant et les adhésifs utilisés doivent être le moins allergisants possible pour éviter les risques d'irritation et d'infection éventuels.

### ***3.2.6. Voie parentérale***

Les patients pédiatriques gravement malades peuvent nécessiter des traitements médicamenteux lourds, fréquemment administrés par voie parentérale. Les patients les plus concernés par cette voie sont généralement les nouveau-nés [51]. La voie parentérale permet d'éliminer les problèmes d'intolérance gastrique, de non-absorption intestinale ou d'instabilité des substances actives en milieu acide. Les dosages des formes

pharmaceutiques destinées à cette voie doivent être adaptés afin d'éviter des dilutions ou des prélèvements de très faible volume qui réduisent la précision.

**a. Injection intraveineuse (IV)**

L'accès veineux est possible sur le système veineux périphérique en utilisant des tubulures de petite taille. Pour des traitements lourds, l'utilisation de la voie centrale est préférée, et deux possibilités existent: l'utilisation de cathéters avec une fine pointe localisée dans la veine centrale ou de systèmes semi-permanents sur les veines centrales avec réservoir sous-cutané [63]. Les veines périphériques ont une circulation sanguine très lente, le temps de contact avec l'injection est donc très important. Elles peuvent être irritées par des charges osmotiques élevées, par des pH extrêmes ou par la nature chimique des principes actifs et/ou des excipients. La phlébite, la thrombo-phlébite ou l'infiltration tissulaire résultent souvent d'une mauvaise injection [64]. Quand les cathéters sont positionnés dans la veine centrale, la dilution est obtenue plus rapidement car la circulation sanguine est plus rapide.

Beaucoup de principes actifs à injecter sont présentés sous forme de poudres lyophilisées qui doivent être reconstituées avant l'utilisation et, nécessitent donc l'utilisation des diluants. L'information sur le volume de diluants et la nécessité de dilutions additionnelles pour obtenir la dose désirée doit être clairement indiquée. Les débits d'administration, optimum et maximum, doivent être ajustés en fonction du poids de l'enfant (en mg/kg/min).

Les spécialités injectables pédiatriques nécessitent d'être présentes dans une variété de conditionnement et de dosage différents afin d'éviter les risques d'erreurs ou d'imprécisions issus de la réalisation des dilutions. Les volumes résiduels présents dans le système d'administration ou dans les tubulures peuvent être significatifs pour les nouveau-nés; les dispositifs spéciaux destinés à l'administration de faibles volumes devraient être développés à cette attention. L'utilisation de seringues prêtes à l'usage peut être préférée.

Dans le cas où une thérapie exige l'administration de plusieurs principes actifs, les volumes des dilutions, les volumes admissibles et les besoins en sodium peuvent être excédés ou compromettre la nutrition. Les volumes minimums nécessaires à la dilution doivent être bien communiqués.

Les excipients présents dans les formulations contribuent à l'isotonicité du produit. L'injection des préparations ne respectant pas ce caractère peut causer des effets indésirables systémiques graves (thrombose, extravasation, hémolyse, ...). Pour ces raisons, une attention particulière est donnée dans le choix de la nature et de la concentration des excipients.

#### ***b. Injections intramusculaire (IM) et sous-cutanée (SC)***

Certaines spécialités peuvent être administrées aussi bien par voie intramusculaire que sous-cutanée. D'autres produits, au contraire, ne seront compatibles qu'à une seule voie.

Le site et le volume d'injection sont des éléments très importants à prendre en considération. La longueur de l'aiguille doit être adaptée afin d'assurer l'exactitude du site d'injection. Les volumes injectés sont à minimiser et ne doivent pas dépasser 1 mL [49].

Les paramètres de formulation tels que le pH doivent être optimisés pour minimiser la douleur liée à l'injection. L'obtention d'un pH physiologique est recherchée; dans le cas contraire, l'utilisation de tampons à faible pouvoir et ne contenant pas de citrates, classiquement associés à une douleur locale, sera préférée.

L'injection intramusculaire est généralement douloureuse pour les enfants. De ce fait, la voie intraveineuse est préférée. La masse musculaire ainsi que l'épaisseur des muscles de couche adipeuse sont variables chez l'enfant. L'absorption peut donc être aléatoire et des complications sous forme de contractures musculaires ou traumatismes nerveux peuvent être importantes; d'autant plus, lorsque le site d'injection, la taille de l'aiguille ainsi que l'angle d'injection ne sont pas adaptés à l'âge, à la corpulence de l'enfant. Les risques potentiels d'irritation et de dommages musculaires des préparations doivent être évalués. L'addition d'anesthésiques locaux, type lidocaïne, peut permettre de réduire la survenue et la durée de la douleur.

#### ***c. Injection intradermique (ID)***

L'injection intradermique est utilisée pour l'administration de la tuberculine PPD dans le cas du diagnostic de la tuberculose ou pour la vaccination du BCG et très occasionnellement pour l'injection des corticoïdes. Cette technique est très difficile à mettre en œuvre surtout chez les très jeunes bébés, la couche dermique étant fine.

### **3.2.7. Voie pulmonaire**

L'inhalation représente une voie efficace pour une administration locale des principes actifs au niveau des poumons, par exemple, dans le traitement de l'asthme ou de la mucoviscidose. Elle permet également l'administration à visée systémique (pour les peptides ou les protéines) comme une alternative à la voie parentérale. L'intérêt de la voie pulmonaire réside entre autres dans l'absence de premier passage hépatique.

La fraction délivrée aux poumons dépend de plusieurs facteurs, dont la capacité du patient à utiliser correctement le système d'administration. L'âge de l'enfant va essentiellement déterminer le degré de cette capacité.

#### **a. Inhalateurs pressurisés**

Ces systèmes sont efficaces mais requièrent une bonne coordination « main-inspiration », qui ne peut être envisagée chez que les enfants à partir de 8 – 10 ans. De nouveaux inhalateurs pour lesquels la libération de la dose est automatiquement déclenchée par l'inspiration pourraient leur convenir. L'utilisation de chambres d'inhalation associées (spacers) peut permettre d'éviter les problèmes de mauvaise coordination, et ainsi envisager le traitement chez les nourrissons et les jeunes enfants.

#### **b. Inhalateurs à poudre sèche**

Les inhalateurs à poudre sèches sont généralement applicables chez les enfants à partir de 4 ans [50]. La biodisponibilité de ces systèmes d'administration dépend fortement de la capacité et l'intensité d'inspiration du patient pour disperser le contenu de la formulation. Le développement de nouveaux dispositifs d'administration des poudres à inhaler, nécessitant des débits d'inspiration plus faible, pourrait être adapté aux plus jeunes enfants.

#### **c. Nébuliseurs**

Les nébuliseurs les plus récents sont des systèmes peu encombrants et plus efficaces, contrairement aux anciens systèmes. Ils pourraient être adaptés aux petits enfants en raison d'une demande plus faible de coopération de l'enfant [65].

### **3.3. Choix de la forme galénique en fonction de l'âge**

Un des éléments clés dans le développement des médicaments à usage pédiatrique est de trouver la forme la mieux adaptée en regard de l'âge du patient. Très peu d'études ont expertisé l'utilisation de différentes formes galéniques chez la population pédiatrique. De simples constats ont été faits à partir d'analyses de prescriptions médicales [58].

**Tableau 7: Matrice des voies d'administration et des formes galéniques versus les tranches d'âge de l'enfant.**

Voie Forme	Prématuré	Nouveau-né (de 0 à 28 jours)	Nourrisson (de 1 mois à 2 ans)	Enfant périscolaire (de 2 à 5 ans)	Enfant scolarisé (de 6 à 11 ans)	Adolescent (de 12 à 16/18 ans)
<b>Orale</b>						
Solution/Gouttes	2	4	5	5	4	4
Emulsion/Suspension	2	3	4	5	4	4
Effervescent	2	4	5	5	4	4
Poudre/Microgranule	1	2	2	4	4	5
Comprimé	1	1	1	3	4	5
Gélule	1	1	1	2	4	5
Orodispersible	1	2	3	4	5	5
Gomme à mâcher	1	1	1	3	5	5
<b>Nasale</b>						
Solution	3	4	4	4	4	4
Semi-solide	2	3	3	4	4	4
<b>Rectale</b>						
Suppositoire	4	5	5	4	3	2
Lavement	5	4	4	3	3	2
Capsule rectale	2	3	4	4	4	3
<b>Topique/transdermique</b>						
Pâteux	4	4	4	5	5	5
Liquide	4	4	4	5	4	4
Patch transdermique	1	2	2	4	4	5
<b>Parentérale</b>						
Intraveineuse	5	4	4	4	4	3
Intramusculaire	3	3	3	4	4	3
Sous-cutanée	4	4	4	4	4	3
Perfusion	5	4	4	4	4	3
<b>Pulmonaire</b>						
Nébuliseur	2	3	4	5	4	3
Aérosol pressurisé	1	3	4	5	4	4
Poudre à inhaler	1	1	3	4	5	5
<b>Oculaire</b>						
Collyre	3	4	4	4	5	5
Pommade	2	3	4	4	4	4

Une matrice présentée dans le Tableau 7, combinant les différentes classes d'âge, les voies d'administration et les formes galéniques, a été développée par [49] comme support à la problématique. Cette matrice n'a pas pour but de donner des recommandations mais, d'apporter des notions générales d'acceptabilité concernant les formes galéniques pour une classe d'âge. Des notes de 1 à 5 sont attribuées qui indiquent le potentiel d'applicabilité ou d'acceptabilité selon l'âge de l'enfant:

- pour les catégories les plus jeunes, la note correspond essentiellement à une capacité physique à appliquer la forme considérée, soit la note 1 étant attribuée aux formes les moins adaptées et la note 5 aux formes les mieux adaptées;
- pour les plus âgés, c'est la préférence de l'enfant qui est davantage jugée, la majorité des formes galéniques, si ce n'est l'ensemble, étant potentiellement applicable, soit la note 1 étant attribuée aux formes les moins appréciées et la note 5 aux formes les mieux appréciées.

Naturellement, les différences inter-individuelles existent et des enfants du même âge peuvent avoir des capacités différentes vis-à-vis des formes galéniques. L'acceptabilité envers certaines formes va dépendre de plusieurs facteurs comme l'humeur de l'enfant, la pathologie, les habitudes culturelles et/ou familiales, et des différences importantes peuvent être également mises en évidence selon les propriétés de formulation telle que la palatabilité.

### ***3.4. Palatabilité***

Le sens du goût chez l'homme est une perception chimio-sensorielle qui provient de la stimulation des cellules sensorielles (récepteurs du goût) des bourgeons gustatifs localisés sur la langue et le voile du palais. Les récepteurs de goût se développent vers la 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> semaine de gestation puis mûrissent entre la 13<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> semaine. Aussi, les récepteurs aux odeurs sont maturés durant la vie intra-utérine alors que les nouveau-nés manifestent des réponses d'attraction ou d'aversion envers les odeurs dès les premiers instants qui suivent la naissance [66]. De façon innée, l'enfant rejette violemment le goût amer, ce qui est souvent le cas des principes actifs, ceci étant un mécanisme ancestral préventif contre l'ingestion des produits toxiques. La palatabilité devient donc un facteur critique dans l'observance médicamenteuse, en particulier dans le cas de traitements chroniques en pédiatrie, où l'acceptabilité du traitement est strictement corrélée au goût agréable de la préparation à administrer [48], [50], [53], [67].

#### ***3.4.1. Amélioration de la palatabilité des formulations pédiatriques***

L'addition des arômes et/ou des édulcorants est une approche souvent utilisée pour pallier le goût indésirable d'une formulation destinée à l'enfant, notamment pour les formes liquides orales.

Il a été reporté que les enfants éprouvaient plus de difficultés à reconnaître et différencier les saveurs dans un mélange, comparativement à l'adulte, dû notamment à leur compétence d'analyse et de perception moindres. Ces capacités vont se développer durant l'enfance et croître jusqu'à l'adolescence. Cependant, leur capacité à reconnaître une saveur peut aussi être affectée par la concentration de l'arôme et également, par l'apparence de la préparation elle-même. Par exemple, une formulation de couleur brune peut être identifiée comme contenant un arôme chocolat à cause de sa couleur. Ceci montre l'importance de la correspondance entre la coloration et le parfum. Augmenter le degré de connaissance, en évitant l'utilisation d'arômes inhabituels ou de mélanges complexes, accroît la probabilité d'acceptation d'une formulation par l'enfant. Les facteurs sociaux tels que les habitudes alimentaires peuvent avoir impact sur les préférences gustatives des enfants. Des influences culturelles peuvent aussi rentrer en compte et jouer sur les attitudes et les préférences des enfants et les saveurs [49]. Les Tableaux 8a et 8b illustrent certaines recommandations en matière de choix et de sélection d'arômes en fonction des saveurs à masquer et des indications thérapeutiques de la spécialité.

**Tableau 8a: Choix d'arômes en fonction de la saveur à masquer [49].**

Saveur de base	Arômes
Acide	Cerise, citron, citron vert, mandarine, orange, fraise
Alcaline	Banane, caramel, cerise, réglisse, fruit de la passion, pêche
Amère	Cerise, chocolat, pamplemousse, réglisse, fraise, pêche, framboise, tutti-frutti
Salée	Caramel, pamplemousse, citron, orange, vanille
Sucrée	Banane, caramel, chocolat, raisin, vanille

**Tableau 8b: Préférences des arômes en fonction des indications thérapeutiques ciblées en Europe [49].**

Indication thérapeutique	Arôme associé
Douleur, fièvre, allergie, antibiotiques	Cerise, fraise, banane, caramel
Vitamines	Cassis, citron, citron vert, mandarine, orange
Digestion	Citron, citron vert, orange, menthe poivrée



La population pédiatrique est capable de reconnaître la saveur sucrée dans un mélange à un stade très précoce et, d'estimer l'intensité de l'édulcoration. Les enfants semblent préférer des intensités d'édulcoration plus élevées que celles acceptées par l'adulte. Des différences de sensibilité apparaissent entre les filles et garçons entre 4 et 12 ans: pendant cette période, les filles sont plus sensibles aux saveurs sucrées [49]. Il existe trois groupes d'édulcorants utilisables dans les produits alimentaires et pharmaceutiques, qui se distinguent notamment par leur pouvoir sucrant (Tableau 9) [68].

**Tableau 9:** Comparaison entre les édulcorants naturels, les polyols et les édulcorants de synthèse.

	Pouvoir sucrant	Apport énergétique (kcal/g)	Effet sur la glycémie
<b>Edulcorants naturels</b>			
saccharose	1	4	↑
glucose	0,7	4	↑
fructose	1,5	4	peu
<b>Polyols</b>			
isomaltol	0,4	4	peu
sorbitol	0,5	3,7	peu
mannitol	0,7	4	peu
xylitol	2	4	peu
<b>Edulcorants de synthèse</b>			
saccharine	300	0	aucun
cyclamate	30 à 40	0	aucun
aspartame	200	0	aucun
acesulfame K	120 à 200	0	aucun

D'autres techniques existent pour masquer le goût indésirable des principes actifs, telles que l'enrobage de comprimés, la complexation du principe actif avec les cyclodextrines ou les résines d'échange ionique, etc. L'utilisation de ces techniques devrait tenir compte de la sécurité des excipients à l'égard de l'enfant ainsi que de la biodisponibilité des formulations lors de l'administration [53].

### 3.4.2. Méthode d'évaluation de la palatabilité

#### a. Evaluation quantitative du goût à partir d'une méthode analytique

La méthode analytique utilisée est très similaire à un essai de libération et repose principalement sur la détermination de quantité du principe actif libéré dans un milieu aqueux (salive artificielle, par exemple) en un court laps de temps. Elle est considérée

comme une méthode indirecte pour évaluer le masquage du goût, car elle ne contribue pas à l'évaluation de la saveur et du goût sucré des formulations. Cette méthode est souvent utilisée pour évaluer l'efficacité du masquage de goût par enrobage ou par complexation. En effet, le goût du principe actif est effectivement masqué lorsque, durant un court laps de temps (de l'ordre de 1 – 2 minutes), le principe actif n'est pas détecté ou la quantité détectable est inférieure au seuil de perception humaine.

***b. Evaluation quantitative du goût à l'aide d'un analyseur de goût***

L'analyseur de goût ou langue électronique peut détecter le goût d'une manière analogue à la perception gustative humaine. Son principe est que des substances dissoutes dans la solution à tester provoquent des changements du potentiel électrique au niveau des capteurs de l'analyseur. Ces signaux sont fonction de propriétés intrinsèques des substances à tester, dont leur goût. L'évaluation du goût d'une formulation, souvent sous forme liquide, se base sur la comparaison entre la solution à tester et le placebo correspondant sans principe actif. L'intérêt de cette méthode est qu'elle est relativement moins coûteuse, assez simple à réaliser, surtout lors de l'étape du développement.

***c. Evaluation qualitative du goût par un groupe de goûteurs***

Les consommateurs sont reconnus comme la meilleure population cible pour évaluer un produit en ce qui concerne l'aspect gustatif. Ils sont considérés comme des individus présélectionnés pour être des utilisateurs réels du produit testé principalement sous l'angle de la qualité. En accord avec cette définition et compte tenu des différences de perception sensorielle entre adultes et enfants, il est évident que les enfants doivent être considérés comme la population cible la plus appropriée pour tester le goût des formulations pédiatriques.

**Recommandations pour la pratique des tests de goût chez l'enfant**

Lors de l'établissement d'une étude de palatabilité chez l'enfant, il faut tenir compte des aspects clés suivants:

- Brièveté du test en rapport avec la fenêtre attentionnelle étroite des enfants;
- Nécessité d'un test intrinsèquement motivant et « amusant » à faire, compte tenu de la facilité avec laquelle les enfants peuvent être distraits.
- Simplification au maximum de la procédure de test pour qu'elle soit compréhensible même pour de très jeunes enfants (d'âge préscolaire, par exemple).

– Limitation du nombre des variantes testées à quatre au maximum pour s’assurer de la fiabilité de l’évaluation en prévenant la confusion et la fatigue gustative.

Les études de palatabilité ne sont décrites dans aucun guide de la réglementation, mais doivent être considérées comme des études cliniques à réaliser par du personnel qualifié. Elles nécessitent donc l’approbation d’un Comité d’Ethique, le consentement éclairé des parents ou des responsables de l’enfant, et l’accord de celui-ci également, le cas échéant. La question éthique constitue souvent une des difficultés majeures de telles études menées chez l’enfant, qui exige surtout la sécurité des essais auxquels l’enfant participera.

#### Participation et résultats du test

En général, les enfants sont considérés comme aptes à participer à des tests de goût à partir de 4 ans. Les enfants plus jeunes sont souvent timides et réticents. En outre, leur capacité à comprendre et à suivre les instructions est parfois limitée; il leur arrive aussi de se désintéresser du test ou d’avoir des difficultés de concentration pendant toute la durée de l’épreuve. Leur taux d’échec au test peut aller jusqu’à 50 % selon la conception et la durée de celui-ci. Il est aussi fréquent qu’ils soient incapables de communiquer leurs sentiments et leurs préférences [69], [70]. Pour obtenir une meilleure compréhension et une plus grande motivation de la part des enfants, il est recommandé de débiter avec des concentrations élevées de la substance à évaluer (arôme ou édulcorant) ou avec des composés connus (arômes fréquemment utilisés, par exemple), puis de poursuivre le test avec des goûts plus spécifiques et moins courants. Débiter le test par de fortes concentrations de la substance à tester, un édulcorant par exemple, n’est parfois pas une bonne solution en raison du goût sucré déplaisant ou de l’arrière-goût amer de cet édulcorant. Pour éliminer le goût précédent, il peut être nécessaire pour les enfants de se rincer plusieurs fois la bouche, de manger des biscuits salés et d’attendre un moment suffisamment long avant de goûter un autre produit.

#### Evaluation organoleptique: test affectif, analytique et classement

Dans l’évaluation organoleptique, le point le plus important est probablement la définition de l’objectif, à savoir ce que cette étude doit déterminer exactement. De cet objectif dépendront le type et l’âge des sujets, ainsi que les méthodes de conception, de réalisation et d’exploitation de l’étude et de ses résultats [71].

- Le test affectif comprend des sous-tests d'acceptation et de préférence. Les questions habituellement posées sont « quel échantillon préfères-tu ? » et « à quel point l'aimes-tu ? » et « qu'est-ce que tu n'aimes pas ? ».
- Le test analytique suppose la mise en œuvre de méthodologies sensorielles objectives, visant à déterminer les caractéristiques ou les propriétés de la substance testée, sans définition de mesures de l'acceptation ou de la préférence. Le test analytique permet de répondre à des questions comme « quel échantillon est le plus amer ? » ou « quel échantillon diffère des autres ? ». Les méthodes analytiques aident à définir les propriétés organoleptiques de la formulation et à établir des différences entre les variantes, mais ne permettent pas directement de prédire dans quelles mesures ces variantes seront appréciées. Elles sont souvent employées comme outil technique d'aide au développement ou à l'optimisation.
- Le classement est une méthode très simple, utilisable pour obtenir une évaluation analytique ou en termes de préférences (« classe, s'il te plaît, les échantillons par ordre de préférence personnelle » ou « classe, s'il te plaît, les échantillons par ordre d'amertume »). L'avantage de cette méthode réside dans la simplicité de la procédure. Cependant, les résultats de ce type d'évaluation peuvent être biaisés par l'incapacité de l'examineur à maintenir l'effort de mémoire ou d'attention sur toute la durée du test. Cette incapacité peut être plus ou moins prononcée selon l'âge des sujets participant à l'étude.

### Principes d'évaluation

Dans la plupart des cas, on prendra en compte l'odeur, la texture, le goût, l'arrière-goût et parfois l'aspect (en cas de coloration, par exemple). Le questionnaire doit être rédigé dans une langue simple, intelligible et compréhensible pour tous les participants, quel que soient leur âge, leurs compétences sociales et leur stade de développement. Il est recommandé d'utiliser des termes d'usage courant et adaptés à l'âge des participants pour décrire les propriétés des produits:

- sucré, salé, acide et amer pour caractériser le goût,
- mince, épais, visqueux et graveleux pour désigner la texture,
- sucré, salé, acide et amer, mais aussi amer, umami ou frais, pour qualifier l'arrière-goût.

L'évaluation du goût par des enfants dans le cadre d'une étude de palatabilité repose sur le jugement verbal émis et sur l'utilisation de l'échelle d'expressions faciales [72]:

- Faire suivre le jugement verbal d'une évaluation sur une échelle de 1 à 5 par exemple (1 correspondant à un goût très bon et 5 à un goût très mauvais) facilite ensuite l'évaluation sur le plan statistique des données obtenues [73].
- L'utilisation de l'échelle d'expressions faciales permet l'expression des préférences sur une échelle picturale.

En dessous de 5 – 6 ans, l'enfant n'est pas considéré comme apte à exprimer des différences de perception du goût par la méthode des préférences. Pour cette tranche d'âge particulière (< 5 ans), on pourrait obtenir une estimation fiable des différences de perception à partir des jugements verbaux exprimés spontanément en réponse à une question type. Il est impossible d'utiliser uniquement l'échelle d'expressions faciales pour différencier les goûts perçus lors du test des formulations par les plus jeunes. L'expression faciale des jeunes enfants peut être liée à d'autres choses que le goût (un visage heureux peut signifier je ne vais pas rester plus longtemps dans cet hôpital, un visage triste refléter la douleur ou la gêne, par exemple). Les expressions faciales et le comportement du sujet lui-même (grimace, haussement d'épaules, vomissement ou rejet en crachant la formulation) peuvent aussi refléter le degré d'acceptation de la formulation testée [69], [70]. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats d'une étude de palatabilité menée chez des jeunes enfants, il est suggéré de faire participer leurs parents, leurs responsables ou leurs soignants, et de les interroger à propos de la gêne ou autre manifestation qu'ils observent en rapport avec l'acceptation du médicament étudié. Les enfants plus âgés, dont le jugement est plus critique, sont en mesure de différencier les formulations à la fois par des jugements verbaux et par une cotation sur l'échelle d'expressions faciales.

Quels que soient l'âge des enfants et le mode d'évaluation choisi, il est suggéré d'introduire dans le test des questions portant sur l'évaluation globale du goût de la formulation, telles que: « quelle était la meilleure formulation ? » ou « quelle était la plus mauvaise ? ». Des approches similaires sont applicables pour l'évaluation des arômes : « quel arôme parmi ceux que tu as goûtés as-tu le plus aimé ? » ou « quel arôme as-tu trouvé le plus mauvais ? ».

### **3.5. Excipients**

L'IPEC (International Pharmaceuticals Excipients Council) définit l'excipient comme une substance pharmaceutique inactive, évaluée pour une utilisation en toute sécurité, ajoutée volontairement et incluse dans une forme galénique pour aider l'administration du principe

actif. Néanmoins, étant donnés les mécanismes de métabolisme et d'élimination encore immatures, certains excipients peuvent avoir des effets notoires particulièrement chez l'enfant.

L'excipient à effet notoire est un excipient susceptible de provoquer, éventuellement, chez certains patients des réactions d'allergies ou d'intolérance. Une liste des excipients à effet notoire mise à jour par la Commission Européenne en 2003 peut servir de support aux formulateurs lors du développement des formulations pédiatriques [74].

Les excipients suivants ne sont pas une liste exhaustive mais l'objectif est de traiter les principaux excipients à effet notoire de la liste dont certains effets indésirables sont susceptibles d'apparaître ou sont déjà décrits chez la population pédiatrique [49], [75].

### **3.5.1. Conservateurs**

Les conservateurs sont utilisés pour prévenir des altérations dues aux micro-organismes (bactéries, levures, moisissures). Ils se distinguent en deux groupes: les conservateurs issus de substances minérales (nitrates et nitrites, sulfites, ...) et les conservateurs issus de substances organiques (acide benzoïque et des benzoates, ...).

#### **a. Sulfites**

La présence de ces substances dans de nombreux aliments (sodas, produits surgelés) et surtout dans les médicaments (injectables, sirops, enveloppe des gélules) peut être à l'origine d'effets secondaires importants chez l'enfant. En 1973, un bronchospasme induit par l'inhalation de sulfites à l'ouverture d'un sachet de fruits secs a été décrit chez l'enfant aux Etats-Unis. En 1980, la description de réactions sévères chez l'enfant asthmatique est apparue à une fréquence estimée à 5 – 10%. Outre les manifestations bronchiques, urticaire et choc anaphylactique peuvent être associés [76]. Les réactions sont en fonction du taux résiduel de sulfites, de la sensibilité du patient. Les doses réactogènes pédiatriques s'échelonnent de 10 à 400 mg [77]. Aucune dose seuil n'est décrite dans la liste des excipients à effet notoire pour les sulfites. L'utilisation jusqu'à 3 mg/jour est autorisée sans risque pour la population pédiatrique.

#### **b. Alcool benzylique**

L'alcool benzylique est un liquide incolore, inflammable et irritant, se présentant comme un excipient à effet notoire avec un seuil d'exposition à 90 mg/kg/jour. L'alcool benzylique est souvent utilisé comme agent antimicrobien dans les formes injectables. Il

peut s'avérer toxique chez les nouveau-nés et les prématurés étant donné leur immaturité métabolique. Il est contre-indiqué pour les enfants jusqu'à 3 ans pour des raisons d'allergies possibles de type anaphylactiques. De plus, il provoque des douleurs au site d'injection.

### ***c. Acide benzoïque***

Chez les prématurés et les nouveau-nés de moins de 8 semaines, il existe un risque d'accumulation d'acide benzoïque avec, pour conséquence, une augmentation de la bilirubinémie consécutive, pouvant aggraver l'ictère du nouveau-né vers un ictère nucléaire.

## **3.5.2. Edulcorants**

### ***a. Saccharose***

Le saccharose ou sucrose est un disaccharide formé par la condensation d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Il est hydrolysé dans l'intestin pour être absorbé en monosaccharide (glucose et fructose). Il n'est pas donc recommandé chez les enfants qui souffrent d'intolérance au fructose. Les formulations avec une grande quantité de saccharose, telles que les sirops, devraient être bannies dans les thérapeutiques pédiatriques surtout chez les sujets atteints de diabète. Le saccharose peut être remplacé par un autre édulcorant. D'autre part, le sucre provoque une diminution du pH au niveau de la plaque dentaire ce qui dissout l'émail des dents et, se présente comme un promoteur de caries dentaires. Il n'y a pas de taux limite, cela dépend plus de la variabilité individuelle.

### ***b. Fructose***

Le fructose provoque une élévation du taux de glucose dans le sang et devrait par conséquence être évité chez les patients atteints de diabète. Ce sucre est aussi contre-indiqué aux enfants qui souffrent d'intolérance au fructose (maladie génétique héréditaire). Le fructose peut être la cause d'effets laxatifs, de ballonnement et de flatulences excessives s'il est administré à forte dose, soit plus de 50g/jour par voie orale.

### ***c. Polyols***

Le sorbitol et le xylitol sont des glucides de la famille des polyols. Ces sucres peuvent être considérés comme sans risque pour des patients diabétiques mais aussi une arme dans la prévention de la carie dentaire [78]. Les polyols ont une plus faible absorption intestinale que les glucides traditionnels, leur valeur calorique est donc moindre. Cependant, ils

peuvent être à l'origine de diarrhées osmotiques avec flatulences abondantes car ils sont absorbés lentement et sont incomplètement métabolisés au niveau des muqueuses intestinales.

Le sorbitol a une application dans différentes formes alimentaire et pharmaceutique. C'est un agent humectant et stabilisant dans les produits nutritionnels de type confiserie, pâtisserie, charcuterie, sauces, etc. Convenant aux diabétiques, il est très utilisé pour de nombreuses confiseries et dans les gommes à mâcher sans sucre. Il est utilisé comme diluant dans des comprimés, édulcorant dans les formes orales en particulier liquides, adjuvant isotonique pour les solutions injectables, humectant dans les pommades ou encore comme principe actif dans des préparations contre la constipation grâce à son effet laxatif. Comme le sorbitol est métabolisé en fructose, il est contre-indiqué chez les enfants intolérants au fructose. Dans certains cas sévères, si le sorbitol est administré par voie intraveineuse, il peut causer des dommages hépatiques accompagnés parfois d'un coma qui peut avoir une issue fatale. L'utilisation du sorbitol par cette voie est à proscrire.

Parmi les polyols, le xylitol présente le pouvoir sucrant le plus important, comparable à celui de saccharose. Il donne une forte sensation rafraîchissante, tout en demeurant non cariogène. Le xylitol est utilisé pour masquer le goût de certains principes actifs ayant une amertume. Il est utilisé dans de nombreux sirops contre la toux, en nutrition parentérale ou dans des comprimés de vitamines. Le xylitol peut provoquer des troubles digestifs ou des diarrhées osmotiques quand il est utilisé comme excipient à une dose supérieure à 10 g/jour. Le xylitol peut être utilisé comme principe actif dans le traitement des constipations à une dose supérieure à 35 g/jour.

#### ***d. Aspartam***

Il s'agit d'un produit de synthèse dipeptique provenant de l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine. Il possède un pouvoir sucrant de 150 – 200 fois plus important que le saccharose et est utilisé comme additif alimentaire, édulcorant intense. Son utilisation est interdites dans la fabrication des aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge (moins de 2 ans) [78]. La phénylalanine peut s'avérer nocive chez des patients atteints de phénylcétonurie (maladie génétique autosomique récessive rare). Les enfants qui n'ont aucun régime restrictif et qui ne sont pas malades peuvent ingérer en toute sécurité jusqu'à 10 mg/kg/jour.



### **3.5.3. Diluants et solvants**

#### **a. Lactose**

Le lactose est un disaccharide, composé d'une molécule de  $\beta$ -D-galactose et d'une molécule de  $\beta$ -D-glucose. Il est hydrolysé par la lactase intestinale avant d'être absorbé au niveau de l'intestin. L'intolérance au lactose est due à une diminution des activités de la lactase. Chez les bébés et les jeunes enfants présentant cette intolérance, on peut retrouver des diarrhées sévères prolongées, des déshydratations voire des acidoses métaboliques. Si la quantité de lactose dans la dose maximale journalière du médicament dépasse 5 g/jour, il faut en tenir compte dans la ration journalière de sucre pour les patients diabétiques.

#### **b. Ethanol**

L'éthanol est un solvant couramment rencontré dans les préparations liquides orales. L'administration d'éthanol présente d'éventuelles interactions avec d'autres médicaments, dont les conséquences peuvent être cinétiques (altération de l'absorption, du métabolisme, accumulation des métabolites, ...) ou dynamiques avec possible sommation d'effets sur le système nerveux central et également, risque d'effet antabuse. Les risques sont communément décrits lors d'intoxications aiguës. Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne les intoxications chroniques. Il en est de même lors de l'utilisation de ces médicaments chez les groupes à risque tels que les enfants épileptiques et les enfants dénutris.

Récemment, en décembre 2006, la Commission d'AMM a approuvé un rapport concernant le seuil d'éthanol acceptable dans les préparations pédiatriques [79]. Par principe, l'éthanol ne devrait pas être inclus dans les médicaments administrés chez l'enfant. Néanmoins, si l'éthanol est indispensable pour solubiliser le principe actif, les recommandations suivantes sont faites:

- Les médicaments de prescription médicale facultative à visée pédiatrique doivent avoir une concentration d'éthanol limitée à 5% et/ou la quantité d'éthanol dans tous les médicaments administrés ne devrait pas produire une concentration sanguine en éthanol supérieure à 0,125 g/L.
- Le volume total en éthanol doit être adapté de façon à ce que, lors d'une intoxication accidentelle chez l'enfant, impliquant ce conditionnement entier, une dose potentiellement létale (3 g/kg) ne puisse être atteinte. De façon opérationnelle, on peut proposer une quantité maximale par conditionnement équivalente à 2 g/kg pour un enfant de 12 – 18

mois (10 kg environ), âge usuel de ces intoxications accidentelles. Ceci équivaut une quantité de 20 g au maximum par flacon, ce qui représente par exemple 100 mL d'une solution à 25°.

- Un intervalle d'au moins 4 heures entre deux prises de médicaments doit être respecté afin d'éviter l'accumulation. La durée de traitement doit être limitée à 4 – 5 jours afin d'éviter une imprégnation prolongée.
- Un bouchon de sécurité est obligatoire pour les médicaments ayant un titre alcoolique supérieur à 5%.
- Il est souhaitable que l'administration chez l'enfant de médicaments à prescription médicale facultative contenant de l'alcool puisse faire l'objet d'un avis médical préalable notamment pour vérifier l'absence d'éventuelle contre-indication/interaction ou que d'autres produits contenant de l'alcool ne soient pas utilisés de façon concomitante.
- L'information sur le contenu en alcool doit figurer de façon apparente et explicite pour tous les médicaments incluant cet excipient. La notice doit en tenir compte dans les précautions d'emploi.

### ***c. Propylène glycol***

Le propylène glycol a fonction de solvant et humectant dans les préparations liquides orales et pâteuses. Il peut aussi être utilisé par voie parentérale notamment pour des substances qui sont faiblement solubles en milieu aqueux. Chez les enfants de moins de 4 ans, la voie métabolique hépatique est limitée, et donc l'activité de l'alcool déshydrogénase n'est pas acquise complètement. Par conséquent, le propylène glycol peut s'accumuler dans l'organisme. Chez les nouveau-nés, la demi-vie du propylène glycol est de 16,9 h alors qu'elle est de 5 h chez l'adulte. Il peut causer principalement la dépression du système nerveux central. D'autres effets indésirables apparaissent comme une augmentation de la pression osmotique induisant les effets laxatifs. L'administration dans le cadre de traitements topiques peut aussi induire des dermatites d'irritation en raison de contact répétés chez les enfants hypersensibles.

### ***3.5.4. Colorants***

Généralement, les enfants préfèrent des préparations avec des couleurs plutôt vives. Cependant, les colorants devraient être évités quand ce n'est pas une nécessité. Car, ils sont fréquemment associés à des réactions d'hypersensibilité et en particulier, au trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention chez l'enfant [80], [81].

#### 4. Conclusion

Dans l'effort de développement des médicaments pédiatriques, exprimé par un réel besoin, beaucoup de lacunes demeurent dans la connaissance et l'information des formulations destinées à la population pédiatrique. De nombreux challenges ont pu être identifiés: challenge pharmacologique dû à l'hétérogénéité physiologique des différentes catégories de la population pédiatrique, challenge éthique par la nécessité de réaliser des études cliniques sur les enfants, challenge réglementaire afin de mettre en place des actions permettant d'inciter le développement et la recherche par les industriels et enfin, challenge galénique par le besoin d'adapter les formes galéniques.

Il est clairement attendu et nécessaire de développer des formulations pharmaceutiques innovantes pour améliorer la facilité d'accès du médicament aux enfants. Les principaux axes de recherche et de développement pourraient être [53]:

- développement de nouvelles voies d'administration telles que la voie orale-transmucosale, voie intra-nasale et transdermique (principalement pour les nouveau-nés),
- recherche d'excipients alternatifs inertes, plus sûrs pour une utilisation chez la population pédiatrique,
- recherche et développement de nouvelles formes galéniques.

Dans tous les cas, le développement de formulations adaptées à la population pédiatrique peut représenter un processus long et difficile qui nécessite davantage de travaux scientifiques.

**Références**

- [1] “Médicaments à usage pédiatrique - Synthèse de la législation,” Europa. [Online]. Available: [http://europa.eu/legislation\\_summaries/internal\\_market/single\\_market\\_for\\_goods/pharmaceutical\\_and\\_cosmetic\\_products/122148\\_fr.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/pharmaceutical_and_cosmetic_products/122148_fr.htm).
- [2] N. Hoog-Labouret, “L’enfant orphelin de médicaments - Aspects réglementaires,” Cassis, France, 2003.
- [3] P. Auby, “Pharmaceutical research in paediatric populations and the new EU Paediatric Legislation: an industry perspective,” *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, vol. 2, no. 1, p. 38, 2008.
- [4] J. Zisowsky, A. Krause, and J. Dingemans, “Drug Development for Pediatric Populations: Regulatory Aspects,” *Pharmaceutics*, vol. 2, no. 4, pp. 364–388, 2010.
- [5] A. Tireford, “Aspects réglementaires des médicaments orphelins destinés à la population pédiatrique: Contraintes et opportunités pour l’industrie pharmaceutique,” Université Joseph Fourier, Grenoble, France, 2010.
- [6] O. Bonneaux, “Les essais cliniques en pédiatrie, un enjeu majeur pour le développement des médicaments pédiatriques dans l’union européenne,” Université Henri Poincaré, Nancy, France, 2010.
- [7] “The European paediatric initiative: History of the paediatric regulation.” European Medicines Agency, EMA, 2007.
- [8] “Note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population.” Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), EMEA, 2001.
- [9] M. Le Blond, “Des médicaments à usage pédiatrique - La France passe la main à l’Europe,” *Droit-medical.net*, 2006. .
- [10] “Réglementation relative aux médicaments pédiatriques,” ANSM. [Online]. Available: [http://ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-en-pediatrie/Reglementation-relative-aux-medicaments-pediatriques/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-en-pediatrie/Reglementation-relative-aux-medicaments-pediatriques/(offset)/1).
- [11] Règlement (CE) N° 1901/2006 du parlement européen et du conseil du 12 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique, modifiant le règlement (CEE) n° 1768/92, les directives 2001/20/CE et 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004. 2006, p. L 378/1–L 378/21.
- [12] C. Belorgey, “Le règlement pédiatrique Européen et Guideline Européenne : « Ethique et essais cliniques en pédiatrie »,” 2006.
- [13] B. Boone, “La réglementation sur les médicaments pédiatriques: un jeu d’enfant ?,” *Healthcare Executive*, no. 46, pp. 1–6, 2009.
- [14] “Médicaments pour les enfants : enjeux et perspectives pour l’Afssaps,” *Les matinées avec la Presse*. 2007.
- [15] J. Breitzkreutz, “European perspectives on pediatric formulations,” *Clin Ther*, vol. 30, no. 11, pp. 2146–2154, 2008.
- [16] M. Auloisgriot, “La mise sur le marché des médicaments à usage pédiatrique dans l’Union Européenne et en France: entre incitations et obligations pour l’industrie pharmaceutique,” *Médecine and Droit*, no. 91, pp. 114–120, 2008.

- [17] B. Bensaad, "Mise en oeuvre et bilan du règlement pédiatrique depuis 2007," Paris, France, 2012.
- [18] "Lignes directrices relatives au format et au contenu des demandes d'approbation ou de modification d'un plan d'investigation pédiatrique et des demandes de dérogation ou de report, à la mise en oeuvre de la vérification de conformité, ainsi qu'aux critères d'évaluation concernant la pertinence des études menées." Journal officiel de l'Union Européenne, 2008.
- [19] A. Saint Raymond, "Formulation des médicaments pédiatriques et autorisation de mise sur le marché," Paris, France, 2011.
- [20] "Questions and answers on the paediatric use marketing authorizations (PUMA)." European Medicines Agency, EMA, 2011.
- [21] A. L. Berthier, "Union Européenne: Les études pédiatriques se mettent en réseau," *Pharmaceutiques*, pp. 82–83, 2009.
- [22] Ripps. [Online]. Available: <http://www.ripps.eu/site/default/page.asp?page=97>.
- [23] "The network of paediatric networks at the EMEA- Implementing strategy." European Medicines Agency, EMA, 2008.
- [24] "Report on first workshop on a European Paediatric Research Network (Enpr-EMA)." European Medicines Agency, EMA, 2009.
- [25] "Report on second workshop on a European Paediatric Research Network (Enpr-EMA)." European Medicines Agency, EMA, 2010.
- [26] "Third workshop on European Network of Paediatric research at the EMA (Enpr-EMA)." European Medicines Agency, EMA, 2011.
- [27] "European Network of Paediatric Research at the European Medicines Agency (Enpr-EMA)," EMA. .
- [28] F. Reboul Salze, "La recherche clinique en pédiatrie." Séminaire Ketty Schwartz, Inserm, 2010.
- [29] "Paediatric clinical trials guidance for assessors." WHO, 2011.
- [30] G. Pons, "Modification du devenir des médicaments dans l'organisme au cours de la maturation chez l'enfant," in *Pharmacologie et thérapeutique pédiatriques*, Paris, France: Flammarion médecine-sciences, 1993, pp. 18–22.
- [31] P. L. Morselli, "Influence du développement sur la pharmacocinétique des médicaments chez le nouveau-né, le nourrisson et l'enfant," in *Traité de Biopharmacie et Pharmacocinétique*, Paris, France: Éditions Vigot, 1997.
- [32] A. Bowles, J. Keane, T. Ernest, D. Clapham, and C. Tuleu, "Specific aspects of gastro-intestinal transit in children for drug delivery design," *Int J Pharm*, vol. 395, no. 1–2, pp. 37–43, 2010.
- [33] G. Heimann, "Enteral absorption and bioavailability in children in relation to age," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 18, no. 1, pp. 43–50, 1980.
- [34] S. Agurell, A. Berlin, H. Ferngren, and B. Hellström, "Plasma levels of diazepam after parenteral and rectal administration in children," *Epilepsia*, vol. 16, no. 2, pp. 277–283, 1975.

- [35] S. Werfel, K. Boeck, D. Abeck, and J. Ring, "Besonderheiten der topischen Behandlung im Kindesalter," *Hautarzt*, vol. 49, no. 3, pp. 170–175, 1998.
- [36] Anon, "Intravenous fluid therapy," in *Medicines for children*, London, England: RCPC Publications Ltd, 2004, pp. G54–57.
- [37] P.-P. LeBlanc, "Distribution," in *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique*, 3rd ed., Paris, France: Vigot, 1997, pp. 161–178.
- [38] B. Friis-Hansen, "Body water compartments in children: changes during growth and related changes in body composition," *Pediatrics*, vol. 28, pp. 169–181, 1961.
- [39] J. M. Treluyer, E. Jacqz-Aigrain, F. Alvarez, and T. Cresteil, "Expression of CYP2D6 in developing human liver," *Eur. J. Biochem.*, vol. 202, no. 2, pp. 583–588, 1991.
- [40] I. Vieira, M. Sonnier, and T. Cresteil, "Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period," *Eur. J. Biochem.*, vol. 238, no. 2, pp. 476–483, 1996.
- [41] J. M. Treluyer, G. Gueret, G. Cheron, M. Sonnier, and T. Cresteil, "Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: In-vivo/in-vitro correlation and inducibility," *Pharmacogenetics*, vol. 7, no. 6, pp. 441–452, 1997.
- [42] M. Sonnier and T. Cresteil, "Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver," *Eur. J. Biochem.*, vol. 251, no. 3, pp. 893–898, 1998.
- [43] D. Lacroix, M. Sonnier, A. Moncion, G. Cheron, and T. Cresteil, "Expression of CYP3A in the human liver: Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth," *Eur. J. Biochem.*, vol. 247, no. 2, pp. 625–634, 1997.
- [44] O. Carrier, G. Pons, E. Rey, M. O. Richard, C. Moran, J. Badoual, and G. Olive, "Maturation of caffeine metabolic pathways in infancy," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 44, no. 2, pp. 145–151, 1988.
- [45] A. Pariente-Khayat, E. Rey, D. Gendrel, F. Vauzelle-Kervroëdan, O. Crémier, P. d' Athis, J. Badoual, G. Olive, and G. Pons, "Isoniazid acetylation metabolic ratio during maturation in children," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 62, no. 4, pp. 377–383, 1997.
- [46] R. P. Miller, R. J. Roberts, and L. J. Fischer, "Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children, and adults," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 19, no. 3, pp. 284–294, 1976.
- [47] P.-P. LeBlanc and P. M. Bélanger, "Elimination," in *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique*, 3rd ed., Paris, France: Vigot, 1997, pp. 179–213.
- [48] T. Nunn and J. Williams, "Formulation of medicines for children," *Br J Clin Pharmacol*, vol. 59, no. 6, pp. 674–676, 2005.
- [49] "Reflection paper: Formulation of choice for the paediatric population." Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), EMEA, 2006.
- [50] T. B. Ernest, D. P. Elder, L. G. Martini, M. Roberts, and J. L. Ford, "Developing paediatric medicines: Identifying the needs and recognizing the challenges," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 59, no. 8, pp. 1043–1055, 2007.

- [51] Y. Aujard, *Pharmacologie et thérapeutique pédiatriques*. Paris, France: Flammarion Médecine-Sciences, 1992.
- [52] A. L. Hir, J. C. Chaumeil, and D. Brossard, *Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 9e ed. Issy-les-Moulineaux, France: Elsevier Masson, 2009.
- [53] J. F. Standing and C. Tuleu, “Paediatric formulations - Getting to the heart of the problem,” *Int J Pharm*, vol. 300, no. 1–2, pp. 56–66, 2005.
- [54] J. E. Fontan, F. Mille, F. Brion, F. Aubin, F. Ballereau, G. Benoît, M. L. Brunet, D. Braguier, D. Combeau, P. Dugast, A. C. Gérout, I. May, P. Meunier, C. Naveau-Ploux, V. Proust, F. Samdjee, J. Schlatter, A. Thébault, and M. Vié, “Drug administration to paediatric inpatient,” *Arch Pediatr*, vol. 11, no. 10, pp. 1173–1184, 2004.
- [55] V. Andrieu and J. P. Reynier, “Pharmaceutical development aimed at improving safety for children,” *Thérapie*, vol. 59, no. 6, pp. 599–601, 2004.
- [56] V. Fajolle, C. Dujols, J. C. Darbord, F. Brion, and A. Rieutord, “Oral suspensions of spironolactone, hydrochlorothiazide and captopril: microbiological stability study and clinical use review,” *Journal de Pharmacie Clinique*, vol. 24, no. 1, pp. 23–29, 2005.
- [57] T. E. Kairuz, P. A. Ball, and R. E. K. Pinnock, “Variations in small-volume doses of a liquid antibiotic using two paediatric administration devices,” *Pharm World Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 96–100, 2006.
- [58] E. Schirm, H. Tobi, T. W. de Vries, I. Choonara, and L. T. W. De Jong-van den Berg, “Lack of appropriate formulations of medicines for children in the community,” *Acta Paediatr.*, vol. 92, no. 12, pp. 1486–1489, 2003.
- [59] “Report of the informal expert meeting on dosage forms of medicines for children.” OMS, 2008.
- [60] T. M. Michele, B. Knorr, E. B. Vadas, and T. F. Reiss, “Safety of chewable tablets for children,” *J Asthma*, vol. 39, no. 5, pp. 391–403, 2002.
- [61] H. W. Karl, A. T. Keifer, J. L. Rosenberger, M. G. Larach, and J. M. Ruffle, “Comparison of the safety and efficacy of intranasal midazolam or sufentanil for preinduction of anesthesia in pediatric patients,” *Anesthesiology*, vol. 76, no. 2, pp. 209–215, 1992.
- [62] J. M. Henderson, D. A. Brodsky, D. M. Fisher, C. M. Brett, and R. E. Hertzka, “Pre-induction of anesthesia in pediatric patients with nasally administered sufentanil,” *Anesthesiology*, vol. 68, no. 5, pp. 671–675, 1988.
- [63] E. C. Reis, E. K. Roth, J. L. Syphan, S. E. Tarbell, and R. Holubkov, “Effective pain reduction for multiple immunization injections in young infants,” *Arch Pediatr Adolesc Med*, vol. 157, no. 11, pp. 1115–1120, 2003.
- [64] S. J. Phelps and R. A. Helms, “Risk factors affecting infiltration of peripheral venous lines in infants,” *J. Pediatr.*, vol. 111, no. 3, pp. 384–389, 1987.
- [65] A. Juchet, J. C. Dubus, and G. Dutau, “La nébulisation en pratique chez l’enfant,” *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*, vol. 47, no. 8, pp. 504–507, 2007.
- [66] L. Marlier, “Aux origines du goût,” *Biofutur*, vol. 320, p. 43, 2011.

- [67] A. Cram, J. Breitzkreutz, S. Dasset-Brèthes, T. Nunn, and C. Tuleu, "Challenges of developing palatable oral paediatric formulations," *Int J Pharm*, vol. 365, no. 1–2, pp. 1–3, 2009.
- [68] M. Clarisse, V. Di Vetta, and V. Giusti, "Edulcorants: entre mythe et réalité," *Rev Med Suisse*, vol. 5, pp. 682–686, 2009.
- [69] D. Bagger-Sjöbäck and G. Bondesson, "Taste evaluation and compliance of two paediatric formulations of phenoxymethylpenicillin in children," *Scand J Prim Health Care*, vol. 7, no. 2, pp. 87–92, 1989.
- [70] K. M. Samulak, G. M. El-Chaar, and L. G. Rubin, "Randomized, double blind comparison of brand and generic antibiotic suspensions: I. A study of taste in adults," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 14–17, 1996.
- [71] M. Gillette, "Sensory evaluation: analytical and effective testing," *Perfumer and flavorist*, vol. 15, no. 3, pp. 33–40, 1990.
- [72] J. Sjövall, A. Fogh, B. Huitfeldt, G. Karlsson, and O. Nylén, "Methods for evaluating the taste of paediatric formulations in children: A comparison between the facial hedonic method and the patients' own spontaneous verbal judgement," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 141, no. 4, pp. 243–247, 1984.
- [73] R. W. Steele, M. P. Thomas, and R. E. Bégué, "Compliance issues related to the selection of antibiotic suspensions for children," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–5, 2001.
- [74] "Guidelines : Medicinal products for human use. Safety, environment and information - Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use." Commission Européenne, 2003.
- [75] "'Inactive' ingredients in pharmaceutical products: update (subject review)," *Pediatrics*, vol. 99, no. 2, pp. 268–278, 1997.
- [76] R. A. Simon, "Update on sulfite sensitivity," *Allergy*, vol. 53, no. 46 Suppl, pp. 78–79, 1998.
- [77] B. Añíbarro, T. Caballero, C. García-Ara, J. M. Díaz-Pena, and J. A. Ojeda, "Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 90, no. 1, pp. 103–109, 1992.
- [78] M. Grillaud, D. Bandon, J. Nancy, Y. Delbos, and F. Vaysse, "The polyols in pediatric dentistry: advantages of xylitol," *Arch Pediatr*, vol. 12, no. 7, pp. 1180–1186, 2005.
- [79] "Avis sur le seuil d'éthanol dans les solutions buvables administrées à l'enfant." Comité de coordination de toxicovigilance, 2006.
- [80] L. E. Arnold, N. Lofthouse, and E. Hurt, "Artificial food colors and attention-deficit/hyperactivity symptoms: Conclusions to dye for," *Neurotherapeutics*, pp. 1–11, 2012.
- [81] M. A. Cheeseman, "Artificial food color additives and child behavior," *Environ. Health Perspect.*, vol. 120, no. 1, pp. A15–16, 2012.



# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **CHAPITRE I**

### **Développer et évaluer le masquage de goût du principe actif réalisé par atomisation-séchage. Cas appliqué à l'acétaminophène.**

(Article publié dans International Journal of Pharmaceutics, vol. 434, no. 1-2, pp. 235-242, 2012).

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF TASTE-MASKED DRUG FOR PAEDIATRIC MEDICINES – APPLICATION TO ACETAMINOPHEN

Thanh Huong Hoang Thi<sup>1,2</sup>, Sylvain Morel<sup>3</sup>, Fatma Ayouni<sup>3</sup>, Marie-Pierre Flament<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Université Lille Nord de France, College of Pharmacy, Lille, France*

<sup>2</sup>*INSERM U1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France*

<sup>3</sup>*Alpha M.O.S. Inc., Toulouse, France*

### Abstract

The aim of this work was to produce and characterize taste-masked powders of a model drug (acetaminophen) prepared using potentially tolerable and safe excipients for paediatric use, i.e. sodium caseinate and lecithin. The powders were produced by spray-drying aqueous dispersions. The characteristics of taste-masked drug particles were determined by scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry and X-ray photoelectron spectroscopy to analyse the surface composition of particles. Taste assessment was approached by an indirect method through drug release studies. We developed a method with a syringe pump using small volumes of aqueous medium and low flow rates, to mimic the behaviour in the mouth. This method was compared to the electronic tongue analysis. SEM, DSC and XPS analysis indicated differences in surface composition of spray-dried particles according to the sodium caseinate/lecithin ratio and related it with taste-masking. The “coating” consisting of sodium caseinate and lecithin had a significant role in decreasing the release of drug during the first two minutes and so in taste-masking. Higher content in lecithin resulted in higher taste-masking efficiency. The association of sodium caseinate and lecithin seems to be promising to mask the bitterness of acetaminophen. A good agreement between release study and electronic tongue analysis was established.

**Keywords:** Taste-masked drug, Spray-drying, Electronic tongue, X-ray photoelectron spectroscopy, Drug release studies

---

*\*To whom correspondence should be addressed.*

*Tel:* +33 3 20964040 *Fax:* +33 3 20959009

*Email:* marie-pierre.flament@univ-lille2.fr

## 1. Introduction

Medicines for children have long been a neglected area. The lack of appropriate dosage forms results in children frequently prescribed medicines that are off-label, unlicensed without any data regarding their bioavailability, efficacy and toxicity. Consequently, vulnerable patients within this age group are exposed to a rate of medication errors higher than that for adult patients. Following the implantation of European regulation with respect to medicinal products for paediatric use, scientist community has to speed up for making medicine available for children by encountering multiple problems of paediatric formulation [1]. Indeed, the taste of oral medicine is one of the most crucial factors influencing adherence to therapeutic regimens and therapeutic outcomes [2]. As a lot of active pharmaceutical ingredients exhibit an unpleasant taste, taste-masking becomes particularly important. Basically, taste is transmitted by the interaction of dissolved molecules with different targets located in taste buds on the tongue. The mechanisms of signal transduction after binding of the taste substance can be different depending on the taste quality [3]. Hence, taste-masking strategy implies variety of technologies in order (i) to provide a physical barrier between the active substance and the taste buds during drug uptake by coating, granulation, encapsulation; (ii) to modify the drug solubility by chemical derivatisation, complexation, use of ion-exchange resins, solid dispersions; or (iii) to alter the human taste perception by using sweetener and flavour, bitter blocker substances, etc. [4], [5]. The question raised is if these approaches can respond to requirements that effectively mask the bitterness of drug without alter the bioavailability upon administration [6]. In particular, as the safety data of existing excipients and new excipients in children stay restrictive and insufficient, the selection of excipients types and levels must be more carefully taken [1], [7].

Spray-drying is a well-established, inexpensive and straightforward technology which permits to mask the unpleasant taste of certain ingredients through encapsulation [8], [9]. During this process, appropriate encapsulating materials enable the film formation at the droplet surface as water evaporates. The functional properties of encapsulating agent have an important role on resultant product characteristics e.g. solubility, and therefore the taste-masking efficiency.

Casein is a phosphoprotein making up 20 to 40% of the protein in human milk and about 80% in bovine milk which also constitutes required nutrient composition for infant

formulas [10–12]. Derived product of casein – sodium caseinate – is stated to be un-hazardous and may be regarded as food with not limited acceptable daily intake [13], [14]. Thanks to surface activity and desirable neutral flavour, this latter has been extensively investigated and utilized as an encapsulating agent in a number of applications for food through spray-drying [15–17]. Also, lecithin is a mixture of surface-active agents called phospholipids. Considered as a GRAS substance, there is evidence that phosphatidylcholine, a major component of lecithin, is important as a nutritional supplement to fetal and infant development. Furthermore, choline is a required component of FDA-approved infant formulas [11]. In a preliminary study, lecithin is shown to have complementary effect on slowing down the wettability of spray-dried powder and thus the dissolution of taste-masked powder.

The aim of this study is to produce and characterize taste-masked powders of acetaminophen (used as model drug) prepared by spray-drying using potentially tolerable and safe excipients for paediatric use, i.e. sodium caseinate and lecithin. Taste assessment is approached *in vitro* by an indirect method through drug release studies. We developed a method with a syringe pump using small volumes of aqueous medium and low flow rates, to mimic the behaviour in the mouth. This method is compared to the electronic tongue analysis. To explain the taste-masking, we analysed the composition at the particle surface with the X-ray photoelectron spectroscopy.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

Pulverised acetaminophen from Cooper (Melun, France); casein sodium salt from bovine milk (sodium caseinate) from Sigma Aldrich (Missouri, USA); refined soybean lecithin from Alfa Aesar (Massachusetts, USA); acetonitrile HPLC grade (99.9%) and triethylamine HPLC grade (99.9%) from Fisher Chemical (Leicestershire, England); phosphoric acid powder analytical grade (99.9%) from Merck (Darmstadt, Germany). The materials were used as received.

### **2.2. Methods**

#### **2.2.1. Spray-drying experiment**

The feed dispersions, of which the composition are given in Table I-1, were made by combining acetaminophen, sodium caseinate and lecithin in distilled water and stirring

overnight before being spray-dried in a Mini Spray Dryer B-190 (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). The spray-dryer equipped with a spray nozzle of 0.5 mm orifice diameter was a co-current model, using compressed air as atomising and drying air. The process parameters were described as follow: the temperature of drying air (inlet temperature) was 130°C, resulting in outlet temperature of about 75°C; the spray flow was 300 L/h; the pump feed was 4 mL/min with maximum aspiration. The spray-dried powders were stored at 20°C and 12%RH before analysis.

**Table I-1: Feed dispersion composition in distilled water for spray-drying experiments.**

Formulation	% (w/w)		
	Acetaminophen	Sodium caseinate	Lecithin
1:0.5*	1.0	1.0	0.5
5:1.5*	1.0	5.0	1.5

\* ratio of sodium caseinate to lecithin.

### 2.2.2. Determination of the drug content

A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug was completely dissolved in distilled water and analysed by HPLC in order to determine the drug content of 1:0.5 and 5:1.5 formulations after spray-drying. The analysis was performed on six replicates. The average content and the recovery rate related to the nominal dose were calculated.

The HPLC system was equipped with a ProStar 230 pump, a ProStar 410 auto-sampler, a ProStar 325 UV-Vis detector (Varian Inc., Les Ulis, France). The separation was performed on a Synergi Hydro-RP column (4 µm, 250 x 4.6 mm i.d.) (Phenomenex Inc., Le Pecq, France). The column temperature was maintained at 30°C. The mobile phase was a mixture (16:84 v/v) of acetonitrile and an aqueous phosphate buffer containing monobasic potassium phosphate (20mM), triethylamine (0.2 mL/L) and adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid solution (3N). The flow rate was 1.0 mL/min and the injection volume was 15 µL. The effluent peak was monitored at 243 nm. Chromatographic data were acquired by Galaxie Software.

### 2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction

The particle size distribution of spray-dried powder was measured by a Mastersizer S (Malvern Instruments, Orsay, France) using a 300mm lens. The sample was dispersed in the dry state with compressed air at 4 bars by a powder feeder.

#### **2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM)**

The morphology of spray-dried particle was visualized by a Hitachi S4700 apparatus (Tokyo, Japan) operated at an accelerating voltage of 3 kV. The micrographs were taken from the powder surface previously coated with carbon.

#### **2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD)**

The experiment was performed on a DSC 1 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Samples were placed into non-hermetic aluminium pans and heated from 25 to 250°C at 10°C/min under a nitrogen purge. The reference was an empty aluminium pan. Temperature and enthalpy readings were calibrated using pure indium and zinc.

The crystallinity of the powders was assessed by X-ray diffraction (XRD) with a PANalytical X'Pert Pro MPD diffractometer, equipped with a Cu X-ray tube ( $\lambda_{\text{CuK}\alpha}$ : 1540 Å). Samples were placed into Lindemann glass capillaries (diameter 0.7 mm). The measurements were performed in transmission mode with incident beam parabolic mirror and X'celerator detector.

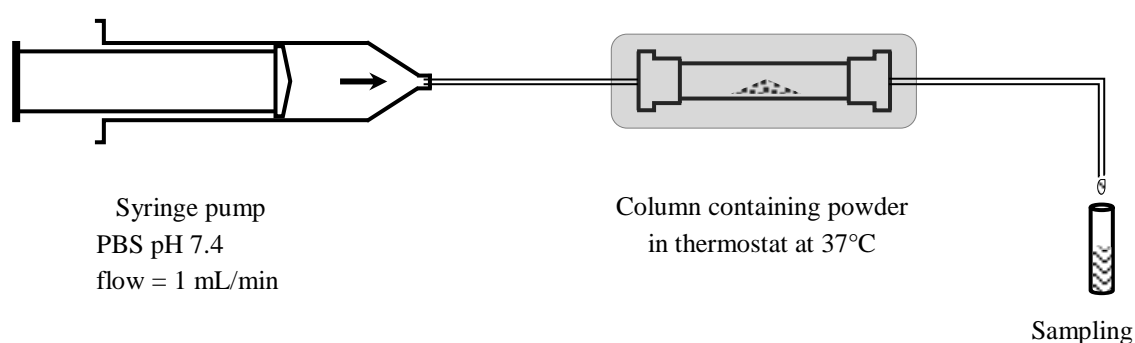
#### **2.2.6. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)**

The XPS measurements were carried out by an AxisUltra DLD spectrometer (Kratos Analytical, Manchester, UK) using a monochromatized aluminium source (Al K $\alpha$  = 1486.6 eV). The spectrometer binding energy scale was initially calibrated against the Ag 3d<sub>5/2</sub> (368.2 eV) level. The powder sample was attached on the sample holder using a double side conductive tape. The experiment was conducted under vacuum of less than 10<sup>-10</sup> torr. The photoelectron take-off angle was perpendicular to the sample. Survey scan was acquired with 160 eV analyzer pass energy at 1.0 eV step for 100 ms dwell time and the high-resolution spectra with 20 eV pass energy at 0.05 eV step for 300 ms dwell time. The analyzed area of the powder was approximately 700 × 400 μm. The C 1s hydrocarbon (285.0 eV) binding energy was used as internal reference. Charge compensation was applied to compensate for the charging effects that occurred during the analysis. Spectra were analysed using CasaXPS software.

#### **2.2.7. In vitro drug release study**

The experiment was performed on a continuous flow system (Figure I-1). A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug were placed in an unpacked Omega column tube (4.6 mm x 5 cm) fitted with 0.5 μm frits and connected with 1.6 mm o.d. tubing at each end.

The column assemble, frits and tubing consisted of PEEK polymer were purchased from Upchurch Scientific (Washington, US). The phosphate buffer saline pH 7.4 (European Pharmacopeia 7.5) was supplied to the column inlet at 1 mL/min by a PhD 2000 syringe pump (Havard Apparatus, Massachusetts, US) that simulates the stimulation rate of saliva in human [18]. Heating (37°C) of the column was achieved using a column heater. Sampling was carried out by collecting the solution at the outlet of tubing at different time points: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes. The released quantity of drug was then determined by HPLC. The release study was also performed with the pure drug for comparison.



**Figure I-1:** Schematic illustration of continuous flow system for *in vitro* drug release study.

### 2.2.8. Electronic tongue (*e-tongue*) analysis

The Astree electronic tongue (Alpha MOS, Toulouse, France) was equipped with an Alpha MOS sensor set # 2, a 48-position auto-sampler and a stirrer. The sensor set consisted of seven cross-selective liquid sensors (ZZ, AB, BA, CA, DA and JE) for pharmaceutical applications, based on chemically modified field effect transistors (ChemFET), i.e. each sensor was enabled to react to several different chemical substances with different sensitivity. The potentiometry was performed using an Ag/AgCl reference electrode. Data were acquired and analysed by AlphaSoft software. The active samples containing 0.4% of drug (w/v) were prepared by adding the powder of pure drug (reference), the 1:0.5 and 5:1.5 taste-masked formulations in deionized water. The corresponding placebo therefore contains water (versus the active sample of pure drug) or aqueous solution of sodium caseinate and lecithin (versus the active samples of taste-masked formulations) at the same excipient content, which manifest no unpleasant taste at the used ratio. For measurement, the electric potential was recorded for 2 minutes but only the signals of the last 20 seconds were taken into account. Samples were replicated at least four times and only the last three

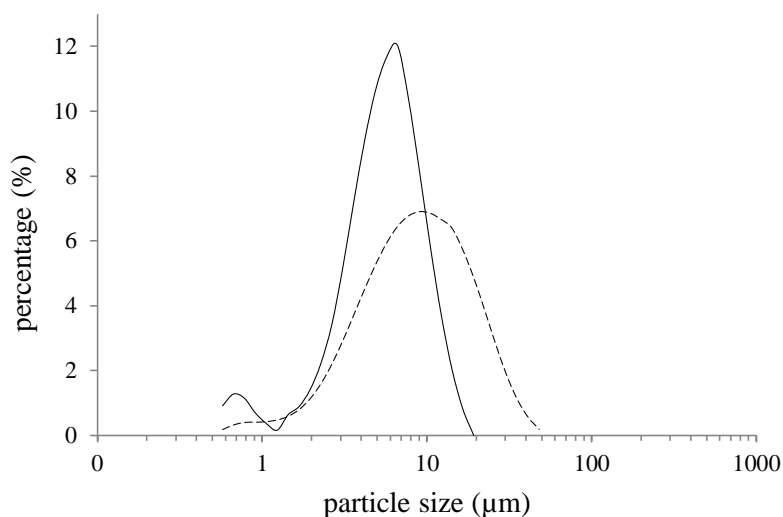


replicates were considered in data analysis. The sensors were rinsed with deionized water following each analysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characteristics of taste-masked drug particles

The drug content of spray-dried powders is determined in the range of 39% and 13.4%, which corresponds to a recovery rate of about 97% and 100% for the 1:0.5 and 5:1.5 formulations, respectively.

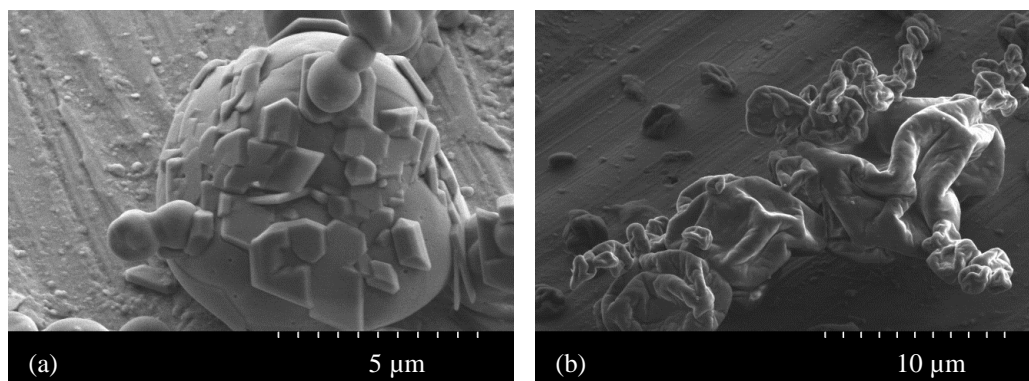


**Figure I-2:** Particle size distribution of spray-dried powders obtained from 1:0.5 taste-masked formulation (full line) and 5:1.5 taste-masked formulation (dashed line).

Figure I-2 represents the particle size distribution of spray-dried powders. Given that the 1:0.5 formulation has a lower solid content in the initial feed dispersion (2.5% w/w against 7.5% w/w for 1:0.5 and 5:1.5 formulations, respectively), this one results in smaller particles with a mean diameter  $D[4,3]$  of 5.6  $\mu\text{m}$  and span of 1.4 in comparison to 10.1  $\mu\text{m}$  and span of 2.2.

The scanning electron micrographs shown in Figure I-3 demonstrate a great difference in the spray-dried particle morphology according to the different ratio of sodium caseinate to lecithin. In the case of the 1:0.5 formulation, the particle is shown being spherical and particularly having some attached crystals which is probably ascribed to the crystallisation of drug onto the surface. In contrast, the 5:1.5 formulation gives a “smooth” surface without appearance of crystalline form and the particle exhibits an irregular form. Such morphology has been typically reported for spray-dried proteins in the literature [19–23]. It

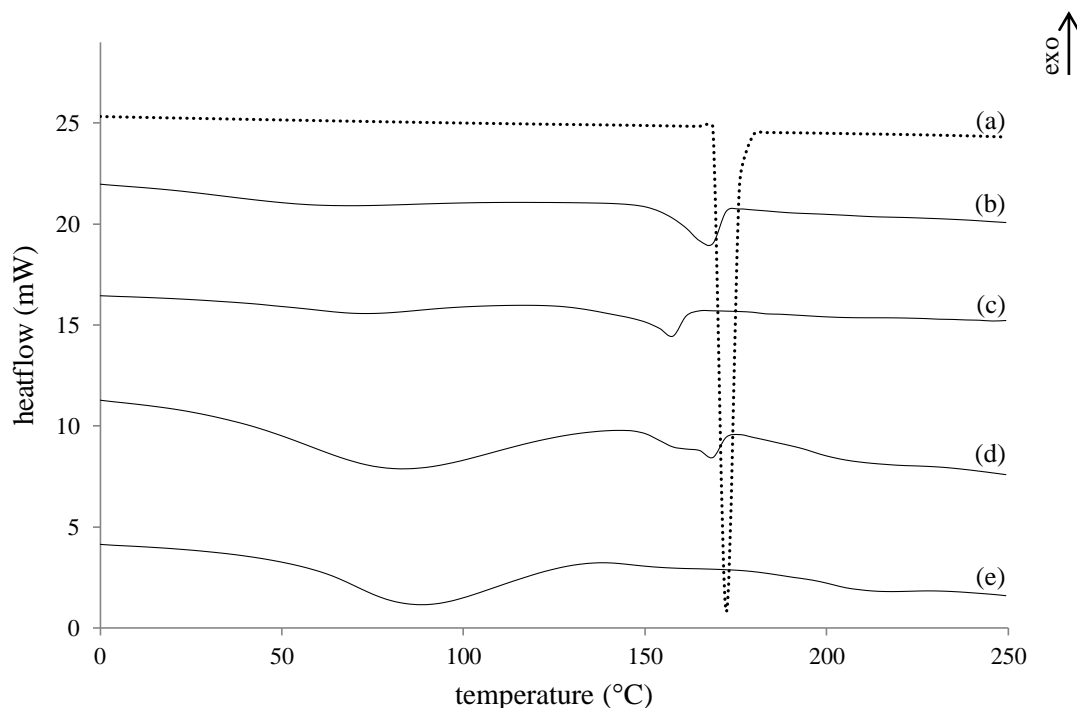
has pointed out that surface-active molecules such as protein absorb preferentially at the air-liquid interface of multi-component droplets and are thus detected with an increased concentration at the surface of the dried particle. In addition, the enrichment of protein on the surface up to a certain extent can modify the particle morphology, which might be the case of 5:1.5 formulation [16], [24–26].



**Figure I-3:** SEM micrographs of spray-dried particles obtained from (a) 1:0.5 taste-masked formulation and (b) 5:1.5 taste-masked formulation.

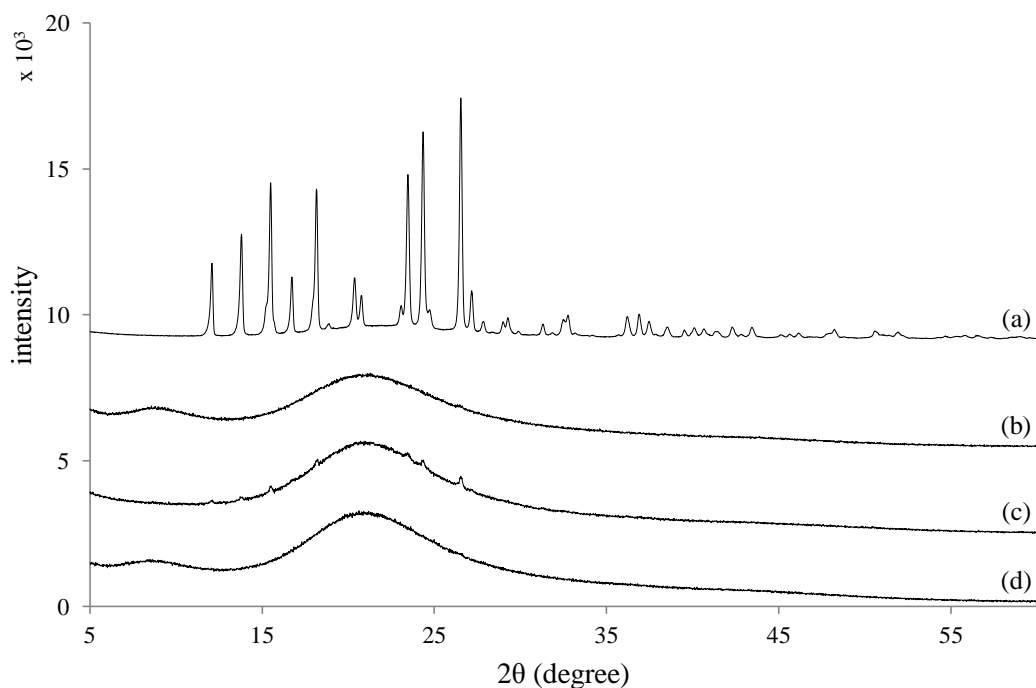
As shown in Figure I-4, the DSC curve of pure drug shows a melting point onset at 169.2°C and a fusion enthalpy of 27.1 kJ/mol (expressed as absolute value). This confirms that the initial acetaminophen used in this study is of monoclinic polymorph (form I). The DSC patterns of corresponding physical mixtures of the 1:0.5 and 5:1.5 formulations reveal also a large endothermic peak of fusion onset at 169.2°C and 169.8°C with a lower fusion enthalpy in the range of 18.1 kJ/mol and 16.1 kJ/mol, respectively. This phenomenon might be explained by the fact that the increasing isolation of the crystalline component prevents an effective heat transmission within the mass of the physical mixture [27]. In particular, this effect is more pronounced in the case of the 5:1.5 mixture with higher content of excipients. Observed derivation of the fusion peak characterizes thus a pre-fusion followed by the fusion of acetaminophen form I. The DSC pattern displays also an only endotherm event at the onset temperature of 158.5°C and an enthalpy of 16.1 kJ/mol for the 1:0.5 spray-dried powder. This implies that, in the case of the 1:0.5 formulation, the crystalline drug present at the surface (as observed on SEM micrographs) and/or drug substance constituted in the core might exist in orthorhombic polymorph of acetaminophen (form II) and melt at a lower temperature with a relatively lower fusion enthalpy [28–31]. It is likely that the crystallisation of form II occurs at the air-liquid boundary of the droplet, where drug substance becomes concentrated so far as the droplet is dried. The form II has remained stable for several months under controlled storage conditions (20°C and 12%RH)

since the moisture was effectively removed through spray-drying. In contrast, no particular peak is recorded for the 5:1.5 spray-dried powder, which indicates that drug might exist under molecular state. It can be explained by the fact that drug molecules in the solution of droplet remain dispersed in the dried particle by the higher amount of available excipients, i.e. sodium caseinate and lecithin.



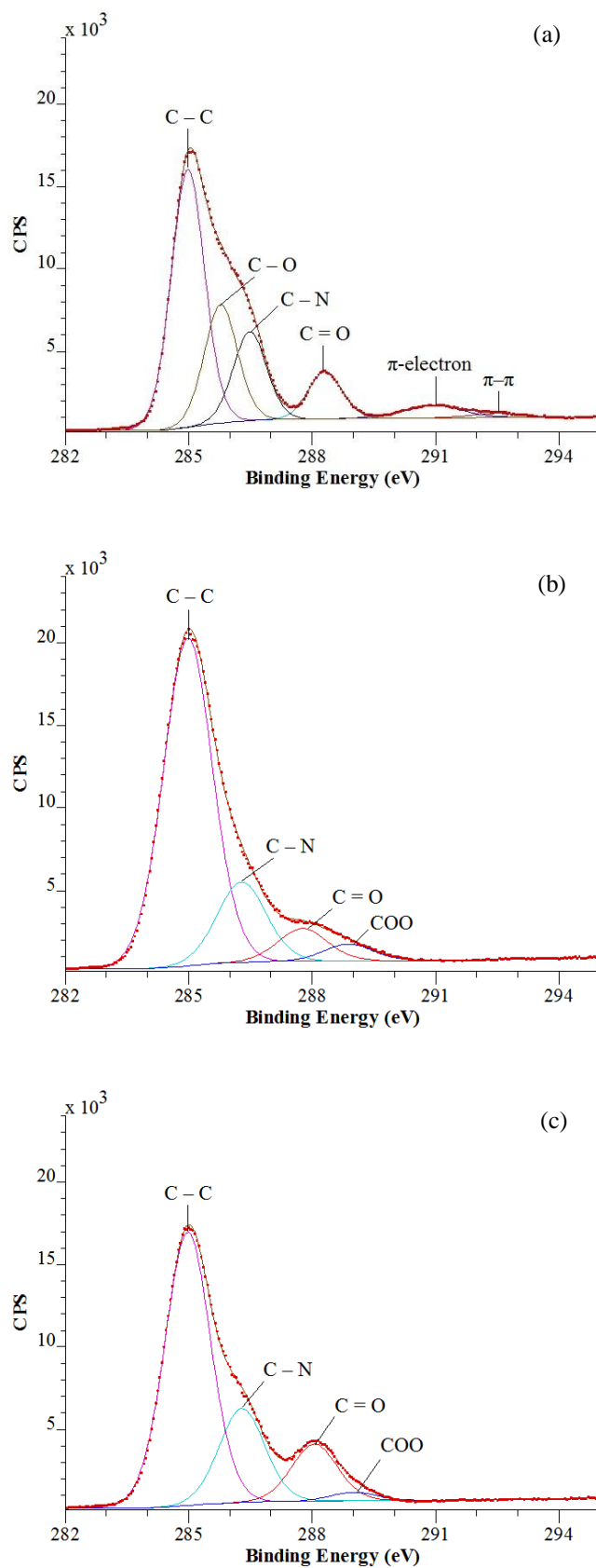
**Figure I-4:** DSC thermographs of (a) pure drug; (b) 1:0.5 physical mixture and (c) spray-dried sample; (d) 5:1.5 physical mixture and (e) spray-dried sample.

The X-ray diffraction confirms the DSC results. In a preliminary study, X-ray diffraction is carried out for spray-dried powders containing the same ratio of drug to sodium caseinate as the two investigated formulations in this paper, except that no lecithin was incorporated. As it can be seen on Figure I-5, only the 1:1 mixture (equivalent to the 1:0.5 formulation) presents some peaks that match with the pure drug and that are not present in the 1:5 mixture (equivalent to the 5:1.5 formulation). The XRD confirms the crystalline form of drug in the 1:0.5 formulation, but it is not the case for the 5:1.5 formulation.

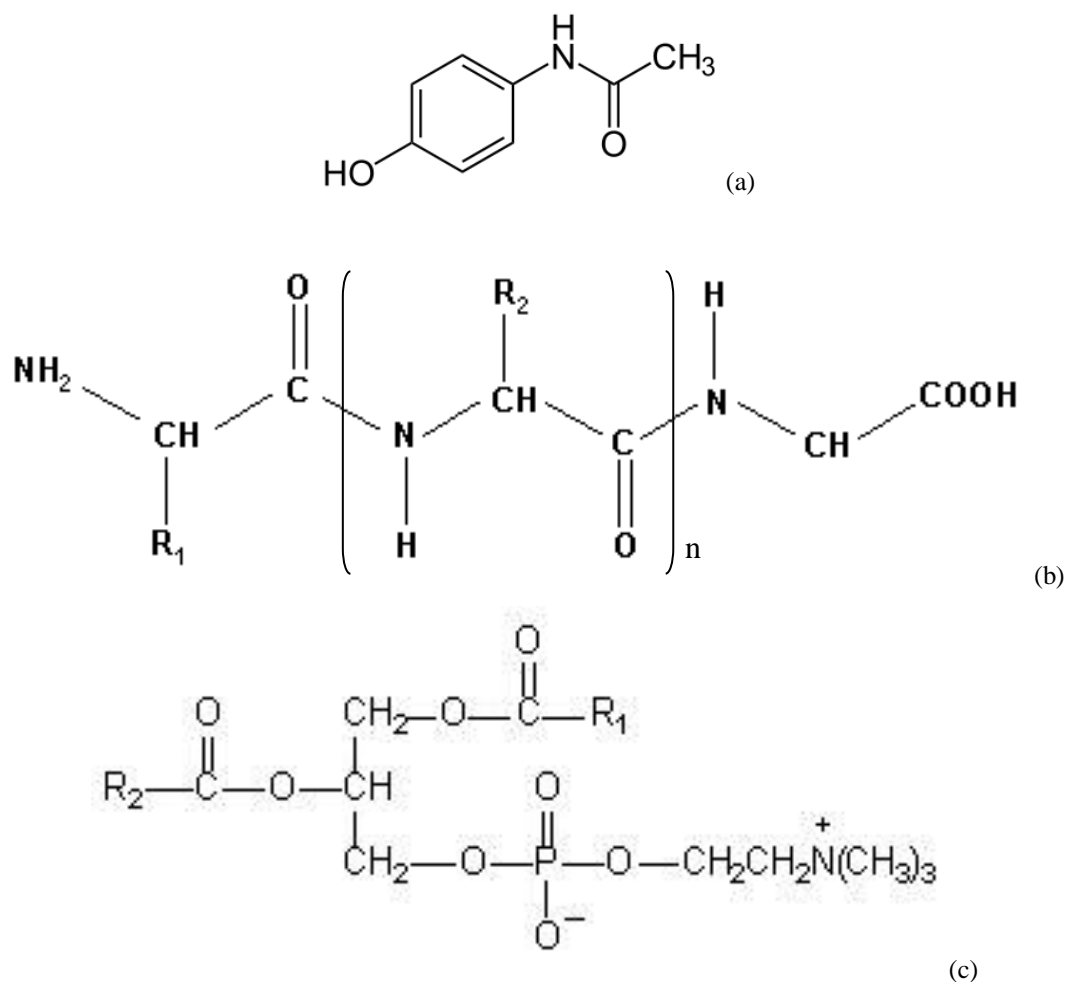


**Figure I-5:** XRD patterns of (a) pure drug, (b) sodium caseinate, (c) 1:1 mixture and (d) 1:5 mixture.

The XPS is a well-established technique that allows getting greater insight about the 10 nm-outermost layer composition of particles which may determine the product properties such as flowability, stability, wettability and even solubility. As shown in Figure I-6, the deconvoluted C 1s spectra of acetaminophen, 1:0.5 and 5:1.5 formulations reveal multiple chemical environments. Only acetaminophen exhibits peaks at 291 and 292.5 eV assigned to the  $\pi$  electrons and  $\pi - \pi$  transitions within the phenyl ring, respectively. That is to say that there is no drug molecule absorbed on the surface of spray-dried particles. This trend seems to be contradictory to the results of SEM and DSC for the 1:0.5 formulation. It suggests that, according to the crystallization conditions, the growth habit results in different manner of molecular stacking for each facet of crystal [30], [32]. As described by [33] and [34], there are strong variations in the surface chemistry of each facet. Also, the noted contributions of acetaminophen might be induced in the arrangement of crystal lattice and is therefore not detectable. In the other hand, the depletion of acetaminophen observed for the 5:1.5 formulation is in agreement with SEM study and will be further discussed.



**Figure I-6:** Deconvoluted C 1s XPS spectra for (a) acetaminophen, (b) 1:0.5 taste-masked formulation and (c) 5:1.5 taste-masked formulation.



**Figure I-7:** Chemical structure of (a) acetaminophen, (b) sodium caseinate, (c) lecithin.

The composition of sodium caseinate involves a small atomic concentration of Na 1s and S 1s attributed to the alkali trace due to the manufacture and the cysteine of polypeptide chains, respectively. These elements imply the presence of sodium caseinate at the surface of both spray-dried powders as shown in Table I-2. In particular, more intense intensity around 531 eV assigned to C=O function corresponding to the peptide bonding of casein (Figure I-7) is observed for 5:1.5 formulation in the O 1s spectra. Moreover, the deconvoluted spectrum of the latter is very similar to sodium caseinate in the relative ratio of C=O/C-O (Table I-3). It indicates an over-representation of sodium caseinate on the surface of 5:1.5 spray-dried powder. The elemental composition determined by XPS shows the most abundance of P 1s for lecithin such that the presence of lecithin contributes to a higher atomic concentration of 1:0.5 formulation in comparison to 5:1.5 formulation (Table I-2). Briefly, the 1:0.5 formulation generates particles with all components in the bulk composition found on the surface, whereas the 5:1.5 particle surface is mostly covered by sodium caseinate.

**Table I-2: Elemental composition for acetaminophen, sodium caseinate, lecithin, the 1:0.5 and 5:1.5 formulations.**

	% in atomic concentration					
	C 1s	O 1s	N 1s	P 1s	Na 1s	S 1s
Acetaminophen	76.0	15.9	8.1	–	–	–
Sodium caseinate	70.7	15.2	13.3	0.2	0.3	0.2
Lecithin	81.1	16.2	1.0	1.3	–	–
1:0.5 formulation	79.2	14.3	5.5	0.8	0.1	0.1
5:1.5 formulation	75.1	14.5	9.7	0.4	0.2	0.2

**Table I-3: Deconvolution of O 1s spectra for acetaminophen, sodium caseinate, lecithin, the 1:0.5 and 5:1.5 formulations.**

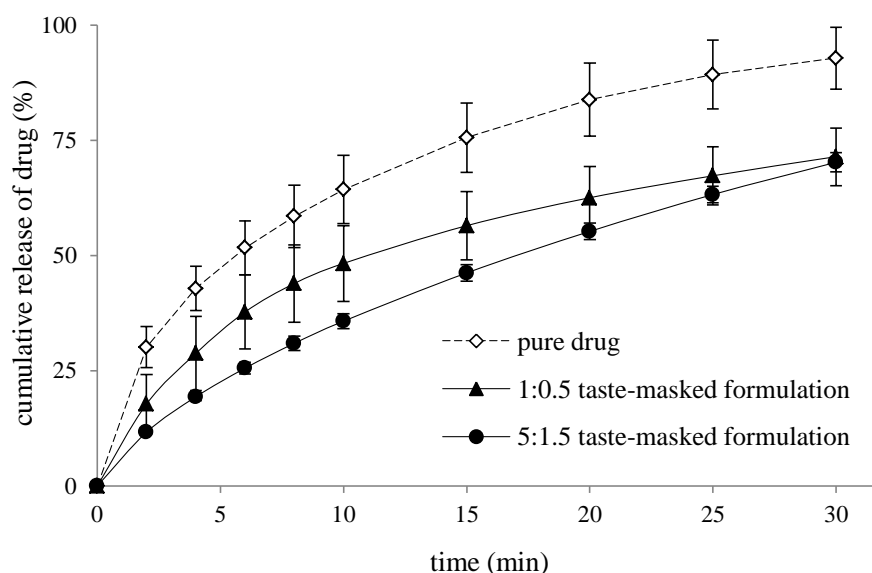
	Function	Binding energy (eV)	% in atomic concentration
Acetaminophen	C=O	531.9	35.6
	C–O	533.3	63.0
Sodium caseinate	C=O	531.6	72.0
	C–O	533.1	24.6
Lecithin	C=O	531.4	25.0
	C–O	533.6	25.0
1:0.5 formulation	C=O	531.4	35.1
	C–O	533.6	14.1
5:1.5 formulation	C=O	531.6	72.1
	C–O	533.1	27.9

### 3.2. Taste-masking evaluation by drug release study and e-tongue analysis

Although the human taste panel is a preferential method for taste assessment, this is challenging for paediatric population as the taste panel established in children is quite difficult to perform because of safety, children's cognitive ability, sociocultural difference, cost and ethical issues, etc. In addition, if adults are implied as assessor, it is not consistent to extrapolate the result onto the paediatric population [35], [36]. In this study, two *in vitro* methods are utilized for taste-masking evaluation, including drug release study and Astree e-tongue analysis. A good agreement between these two methods is established and thus may offer alternative solutions for taste assessment in the early stage of drug development.

Taste-masking is achieved if, within the frame of 1 – 2 min, drug substance is either not released or the released amount is below the human threshold for identifying its bad taste. In this study, the release of drug is monitored using a novel continuous flow system that

allows not only mimicking the realistic conditions in the mouth, but also effectively predicting the taste-masking effect. Figure I-8 shows the release profiles as a function of time for unmasked acetaminophen (pure drug), the 1:0.5 and 5:1.5 formulations. Considering the concentration of released drug within the first two minutes, we obtained 0.91 mg/mL and 0.76 mg/mL for the 1:0.5 and 5:1.5 formulations, respectively. The bitterness threshold reported in the literature is highly varying. For example, Albertini et al. found a value of 1.08 mg/mL [37] whereas Shiino et al. found 35  $\mu\text{g/mL}$  [38]. We are under the value found by Albertini et al. but not under the one of Shiino et al. So, further works are carried out in order to decrease the release within the first two minutes. It is clear that the “coating” consisted of sodium caseinate and lecithin has a significant role in diminishing the release of drug. Indeed, during first 2 minutes, the 1:0.5 and 5:1.5 formulations demonstrate lower released amounts at 1.7 and 2.5-fold less than the unmasked drug, respectively. As discussed above, in the case of 1:0.5 formulation, a partial drug content present on the surface enables a relatively higher release compared to 5:1.5 formulation (18% against 12%, respectively) in the early minutes. Once the outer layer is washed out, drug released amounts attain the same extent of about 71% after 30 minutes for both taste-masked formulations.

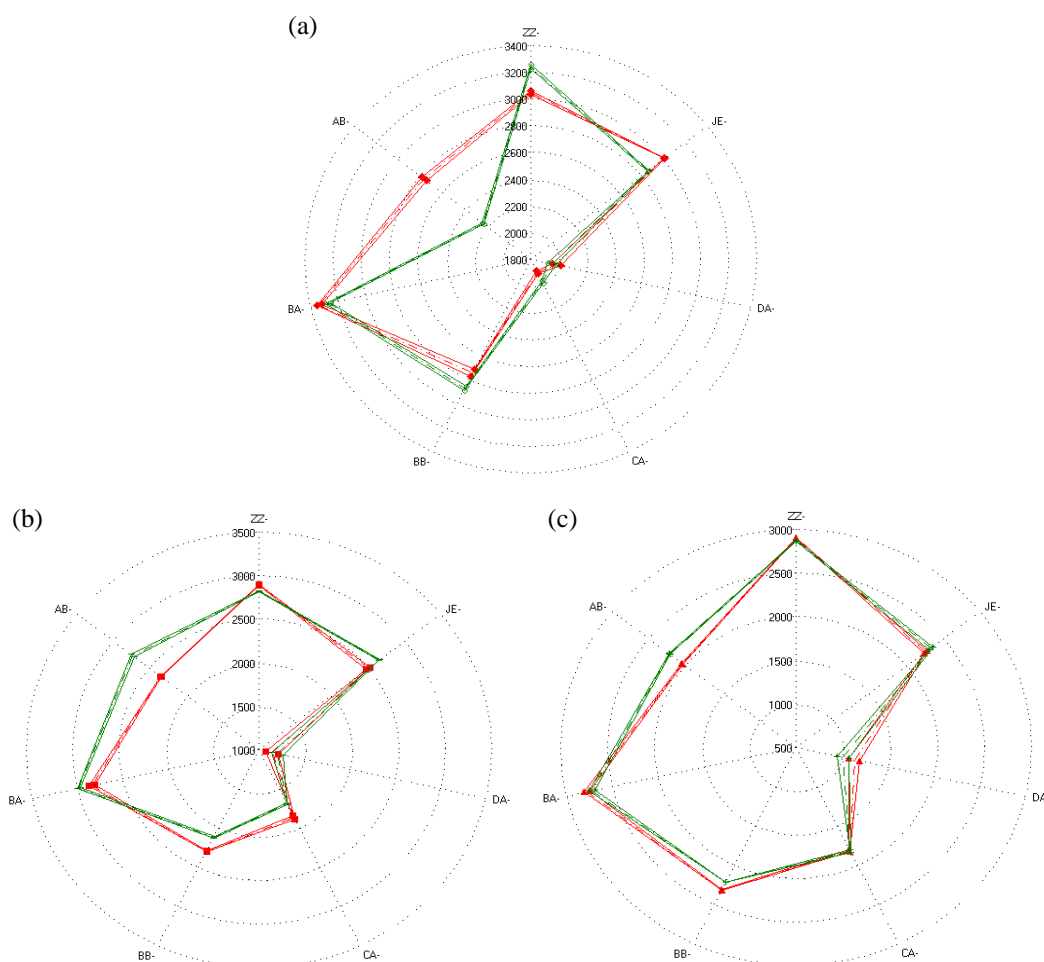


**Figure I-8:** Drug release profiles as a function of time of the 1:0.5 and 5:1.5 taste-masked formulations in comparison to the pure drug studied by the continuous flow system.

More insight about the general taste of taste-masked formulations is also evaluated by means of Astree e-tongue. Figure I-9 plots the responses of seven sensors to sample through the last three replicates. All sensors show stable signals with satisfactory



repeatability (RSD < 5%). The responses from all seven sensors are thus taken into account for data analysis.

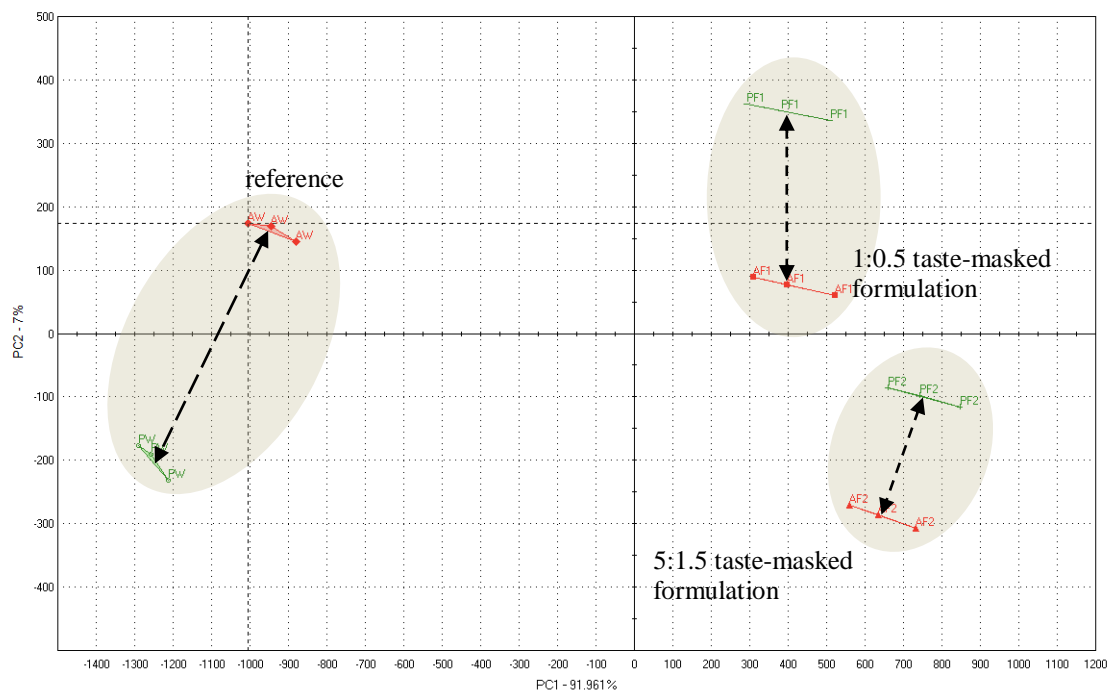


**Figure I-9:** Radar plots of all sensor responses to active samples (in red) and corresponding placebo (in green) through the last three replicates obtained from (a) pure drug, (b) 1:0.5 taste-masked formulation and (c) 5:1.5 taste-masked formulation.

Based on the 7-dimensional data set obtained from these sensors, a principal component analysis (PCA) is applied in order to reduce the dimensional space without losing information. The variance of original data can be almost conveyed within two new axes, i.e. PC1 and PC2. The methodology of the Astree e-tongue in taste assessment bases on the comparison of distances “active versus placebo” calculated from the PCA map between formulations. A shorter distance reveals higher similarity of the active sample to the corresponding placebo in term of taste, i.e. neutral or close to neutral taste of placebo. As shown in Figure I-10, the PC1 and PC2 explain 91.96% and 7% of data variance, respectively. It appears that both 1:0.5 and 5:1.5 formulations are closer to the corresponding placebo, in comparison to the reference of pure drug, therefore reflect a

better taste improvement for taste-masked formulations. The masking efficiency is particularly remarkable for the 5:1.5 formulation which represents the lowest distance. Interestingly, this is in good accordance with results obtained from the drug release study.

Discrimination index = 99



**Figure I-10: Electronic tongue “taste map”:** global signal comparison (PCA analysis of the electrode responses) between pure drug (reference) and taste-masked formulations.

#### 4. Conclusion

The association of sodium caseinate and lecithin seems to be promising to mask the bitterness of acetaminophen. Through spray-drying process, acetaminophen seems to be well encapsulated within the skin former composed of sodium caseinate and lecithin. The spray-drying particle morphology differed according to the ratio of sodium caseinate to lecithin. The SEM, DSC and XPS analysis made it possible to observe differences in the surface composition of spray-dried particles and relate it with taste-masking. With a ratio sodium caseinate to lecithin of 1:0.5, crystals of drug were observed at the surface whereas with the 5:1.5 ratio, particle surface was mostly covered by caseinate. The “coating” consisting of sodium caseinate and lecithin had a significant role in decreasing the release of drug during the first two minutes and therefore is able to mask the drug bitterness upon administration into the mouth. Higher content in lecithin seems to result in higher taste-masking efficiency. A good agreement between the *in vitro* release study developed and

the electronic tongue analysis was established and thus may offer alternative solutions for taste assessment in the early stage of drug development.

### *Acknowledgements*

The authors would like to thank Dr. Anne-Sophie Mamede and Dr. Arnaud Beaurain (Unité de Catalyse et de Chimie du Solide, UMR CNRS 8181, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille) for XPS measurements and for interpreting the XPS results. The authors also thank Pr. Marc Descamps and Dr. Florence Danède (Laboratoire de dynamique et structure des matériaux moléculaires, UMR CNRS 8024, Université de Lille 1) for the XRD measurements.

## References

- [1] T. B. Ernest, D. P. Elder, L. G. Martini, M. Roberts, and J. L. Ford, “Developing paediatric medicines: Identifying the needs and recognizing the challenges,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 59, no. 8, pp. 1043–1055, 2007.
- [2] D. Matsui, “Current issues in pediatric medication adherence,” *Paediatr Drugs*, vol. 9, no. 5, pp. 283–288, 2007.
- [3] B. Lindemann, “Receptors and transduction in taste,” *Nature*, vol. 413, no. 6852, pp. 219–225, 2001.
- [4] D. Douroumis, “Practical approaches of taste masking technologies in oral solid forms,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 4, no. 4, pp. 417–426, 2007.
- [5] Z. Ayenew, V. Puri, L. Kumar, and A. K. Bansal, “Trends in pharmaceutical taste masking technologies: A patent review,” *Recent Pat Drug Deliv Formul*, vol. 3, no. 1, pp. 26–39, 2009.
- [6] A. Cram, J. Breitzkreutz, S. Desset-Brèthes, T. Nunn, and C. Tuleu, “Challenges of developing palatable oral paediatric formulations,” *Int J Pharm*, vol. 365, no. 1–2, pp. 1–3, 2009.
- [7] V. Fabiano, C. Mameli, and G. V. Zuccotti, “Paediatric pharmacology: Remember the excipients,” *Pharmacol. Res.*, vol. 63, no. 5, pp. 362–365, 2011.
- [8] S. Gouin, “Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 15, no. 7–8, pp. 330–347, 2004.
- [9] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, and R. Saurel, “Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview,” *Food Res. Int.*, vol. 40, no. 9, pp. 1107–1121, 2007.
- [10] T. W. Keenan and S. Patton, “The structure of milk: Implications for sampling and storage,” in *Handbook of milk composition*, California, USA: Academic Press, 1995, pp. 5–85.
- [11] D. J. Raiten, J. M. Talbot, and J. H. Waters, “Assessment of nutrient requirements for infant formulas,” *J. Nutr.*, vol. 128, no. 11 Suppl, p. i–iv, 2059S–2293S, 1998.
- [12] J. Abayomi, “Infant formula - Evaluating the safety of new ingredients,” *J Hum Nutr Diet*, vol. 18, no. 3, pp. 226–226, 2005.
- [13] “Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews,” FDA. [Online]. Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogsListing&id=290>. [Accessed: 01-Apr-2012].
- [14] “Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,” WHO. [Online]. Available: <http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=3707>. [Accessed: 01-Apr-2012].
- [15] J. Imagi, T. Yamanouchi, K. Okada, M. Tanimoto, and R. Matsuno, “Properties of agents that effectively entrap liquid lipids,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 56, no. 3, pp. 477–480, 1992.

- [16] S. A. Hogan, B. F. McNamee, E. D. O’Riordan, and M. O’Sullivan, “Microencapsulating properties of sodium caseinate,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 4, pp. 1934–1938, 2001.
- [17] S. S. Bao, X. C. Hu, K. Zhang, X. K. Xu, H. M. Zhang, and H. Huang, “Characterization of spray-dried microalgal oil encapsulated in cross-linked sodium caseinate matrix induced by microbial transglutaminase,” *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 1, pp. E112–118, 2011.
- [18] A. Preetha and B. Banerjee, “Comparison of artificial saliva substitutes,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 18, no. 2, pp. 178–186, 2005.
- [19] Y. F. Maa, H. R. Costantino, P. A. Nguyen, and C. C. Hsu, “The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles,” *Pharm Dev Technol*, vol. 2, no. 3, pp. 213–223, 1997.
- [20] Y. F. Maa, P. A. Nguyen, and S. W. Hsu, “Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone,” *J Pharm Sci*, vol. 87, no. 2, pp. 152–159, 1998.
- [21] N. Y. K. Chew and H. K. Chan, “Use of solid corrugated particles to enhance powder aerosol performance,” *Pharm. Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 1570–1577, 2001.
- [22] J. Elversson and A. Millqvist-Fureby, “In situ coating - An approach for particle modification and encapsulation of proteins during spray-drying,” *Int J Pharm*, vol. 323, no. 1–2, pp. 52–63, 2006.
- [23] R. Vehring, W. R. Foss, and D. Lechuga-Ballesteros, “Particle formation in spray-drying,” *J Aerosol Sci*, vol. 38, no. 7, pp. 728–746, 2007.
- [24] P. Fäldt and B. Bergenståhl, “The surface composition of spray-dried protein-lactose powders,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 90, no. 2–3, pp. 183–190, 1994.
- [25] P. Fäldt and B. Bergenståhl, “Changes in surface composition of spray-dried food powders due to lactose crystallization,” *Lebensm. Wiss. Technol.*, vol. 29, no. 5–6, pp. 438–446, 1996.
- [26] R. Vehring, “Pharmaceutical particle engineering via spray-drying,” *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 999–1022, 2008.
- [27] F. Giordano, A. Rossi, R. Bettini, A. Savioli, A. Gazzaniga, and C. Novák, “Thermal behavior of paracetamol-polymeric excipients mixtures,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 68, no. 2, pp. 575–590, 2002.
- [28] P. Di Martino, P. Conflant, M. Drache, J. P. Huvenne, and A. M. Guyot-Hermann, “Preparation and physical characterization of forms II and III of paracetamol,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 48, no. 3, pp. 447–458, 1997.
- [29] P. Espeau, R. Céolin, J. L. Tamarit, M. A. Perrin, J. P. Gauchi, and F. Leveiller, “Polymorphism of paracetamol: Relative stabilities of the monoclinic and orthorhombic phases inferred from topological pressure-temperature and temperature-volume phase diagrams,” *J Pharm Sci*, vol. 94, no. 3, pp. 524–539, 2005.
- [30] G. Nichols and C. S. Frampton, “Physicochemical characterization of the orthorhombic polymorph of paracetamol crystallized from solution,” *J Pharm Sci*, vol. 87, no. 6, pp. 684–693, 1998.

- [31] M. Sacchetti, “Thermodynamic analysis of DSC data for acetaminophen polymorphs,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 63, no. 2, pp. 345–350, 2000.
- [32] T. Beyer, G. M. Day, and S. L. Price, “The prediction, morphology and mechanical properties of the polymorphs of paracetamol,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 21, pp. 5086–5094, 2001.
- [33] J. Y. Y. Heng, A. Bismarck, A. F. Lee, K. Wilson, and A. R. Williams, “Anisotropic surface energetics and wettability of macroscopic form I paracetamol crystals,” *Langmuir*, vol. 22, no. 6, pp. 2760–2769, 2006.
- [34] J. Y. Y. Heng and D. R. Williams, “Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II,” *Langmuir*, vol. 22, no. 16, pp. 6905–6909, 2006.
- [35] V. Anand, M. Kataria, V. Kukkar, V. Saharan, and P. K. Choudhury, “The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals,” *Drug Discov. Today*, vol. 12, no. 5–6, pp. 257–265, 2007.
- [36] E. H. Davies and C. Tuleu, “Medicines for children: A matter of taste,” *J. Pediatr.*, vol. 153, no. 5, pp. 599–604, 2008.
- [37] B. Albertini, C. Cavallari, N. Passerini, D. Voinovich, M. L. González-Rodríguez, L. Magarotto, and L. Rodriguez, “Characterization and taste-masking evaluation of acetaminophen granules: Comparison between different preparation methods in a high-shear mixer,” *Eur J Pharm Sci*, vol. 21, no. 2–3, pp. 295–303, 2004.
- [38] K. Shiino, Y. Iwao, A. Miyagishima, and S. Itai, “Optimization of a novel wax matrix system using aminoalkyl methacrylate copolymer E and ethylcellulose to suppress the bitter taste of acetaminophen,” *Int J Pharm*, vol. 395, no. 1–2, pp. 71–77, 2010.

## **CHAPITRE II**

### **Optimiser le masquage de goût de l'acétaminophène par le caséinate de sodium et la lécithine à l'aide de plans d'expériences**

(Projet de publication)

## OPTIMIZING THE TASTE-MASKED FORMULATION OF ACETAMINOPHEN USING SODIUM CASEINATE AND LECITHIN BY EXPERIMENTAL DESIGN

Thanh Huong Hoang Thi<sup>1,2</sup>, Mohamed Lemdani<sup>1,3</sup>, Marie-Pierre Flament<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Université Lille Nord de France, College of Pharmacy, Lille, France*

<sup>2</sup>*INSERM U1008 Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France*

<sup>3</sup>*Laboratoire de Biomathématique, College of Pharmacy, EA 2694, Lille, France*

### Abstract

The association of sodium caseinate and lecithin was demonstrated to be promising for masking the bitterness of acetaminophen via drug encapsulation. The encapsulating mechanisms were suggested to be based on the segregation of multicomponent droplets occurring during spray-drying. The spray-dried particles delayed the release of drug within the mouth during the early time and hence masked the bitterness. The aim of this work was (i) to evaluate the effect of various processing and formulation parameters on the taste-masking efficiency and (ii) to determine the optimal formulation for optimal taste-masking effect. Four investigated variables included inlet temperature ( $X_1$ ), spray flow ( $X_2$ ), sodium caseinate amount ( $X_3$ ) and lecithin amount ( $X_4$ ). The percentage of the released amount of drug during the first two minutes was considered as the response variable Y. Indeed, taste-masking is achieved if, within the frame of 1 – 2 minutes, drug substance is either not released or the released amount is below the human threshold for identifying its bad taste. A  $2^4$ -full factorial design was applied and allowed screening for the most influential variables i.e. sodium caseinate amount and lecithin amount. Optimizing these two variables was therefore conducted by the simplex approach. The SEM and DSC results of spray-dried powder prepared under optimal conditions showed that drug seemed mostly to be well encapsulated. The drug release during the first two minutes significantly decreased, 7-fold less than the unmasked drug particles. The optimal formulation which performed the best taste-masking efficiency was successfully achieved.

**Keywords:** Taste-masked drug, Spray-drying, Component segregation, Factorial design, Simplex optimization.

---

\* *To whom correspondence should be addressed.*

*Tel:* +33 3 20964974 *Fax:* +33 3 20959009

*Email:* marie-pierre.flament@univ-lille2.fr



## 1. Introduction

Spray-drying is an inexpensive and straightforward technology that has been widely used in chemical, food and pharmaceutical industry. The process involves the dispersion of a feed solution into small droplets that come into contact with a drying air, so that the droplet moisture removal takes place. This is not only a technique to transform a liquid into a dried particulate form, but also gains interest in particle engineering, e.g. microencapsulation [1–5]. These studies emphasize the beneficial phenomenon that some components have tendency to accumulate on the surface of a multicomponent droplet and therefore enable to encapsulate other component as dried particle forms (Figure II-1). It is attributed to the component segregation within the droplet prior to complete dehydration. A number of mechanisms are discussed in the literature wherein three mechanisms mentioned by [6] are:

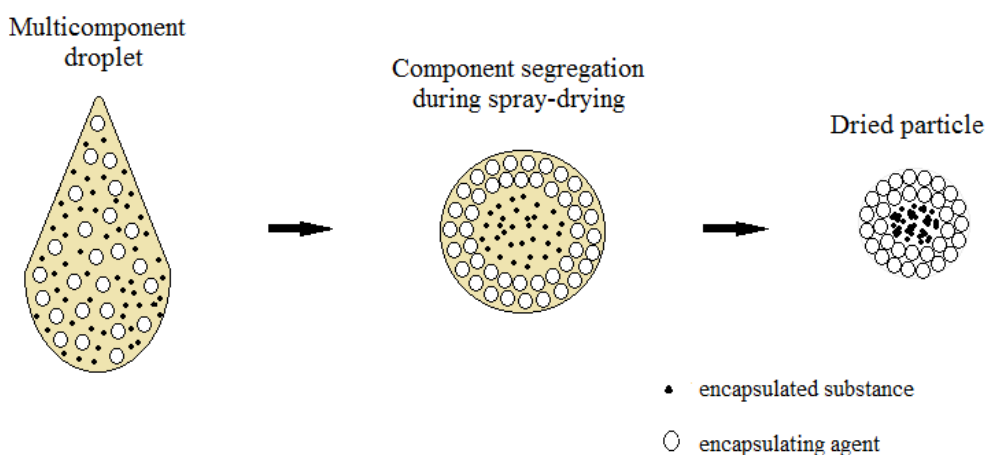
(i) the first mechanism suggests that an initial layer of crust forms on the outermost layer of the droplet. As evaporation continues to occur, the crust increases in thickness towards the center of the droplet. For this hypothesis, the segregation cannot be explained. However, the formation of crust can happen during the segregation of different components.

(ii) the second mechanism suggests that the solvent and/or water migrates towards the surface while the solutes migrate to the center of the droplet. At the surface where evaporation occurs, the concentration of solutes increases. The gradient of concentration results in diffusion of solutes towards the center. As the diffusivity differs from each component, some may travel to the center at a faster rate than the others.

(iii) the third mechanism assumes that surface-active component moves preferentially to the liquid-air interface. As the droplet is created, the surface-active component may quickly form a monolayer on its surface quickly and precipitate out almost instantly by initial heating. This causes a drop in the local concentration near the surface of the droplets. The gradient of concentration further drives the diffusion of the surface-active component from the inner region to the surface of the droplet.

Numerous works studied the effect of various factors on the drying process and therefore the particle formation, e.g. feed concentration, drying temperature, spray flow, etc. [7–15]. Also, some authors proposed the modeling of drying kinetics associated with spray-drying in an attempt to assess the conditions under which the aforementioned mechanisms are dominant [16–19]. Nevertheless, how to determine the advantageous conditions for

investigated system and therefore the desired quality for final product is not thoroughly justified and is commonly case-dependent.



**Figure II-1:** Schematic illustration of encapsulating mechanism via spray-drying.

In the previous study, the association of sodium caseinate and lecithin was demonstrated to be promising to mask the bitterness of acetaminophen by drug encapsulation via spray-drying. The surface composition of spray-dried particles assumed that an appropriate ratio of encapsulating agents might effectively encapsulate the drug, no drug was detected on the particle surface and therefore exhibited a better taste-masking efficiency [20]. The aim of the present work is hence (i) to evaluate the effects of various processing and formulation parameters on the taste-masking efficiency, i.e. inlet temperature, spray flow, sodium caseinate amount, lecithin amount and, (ii) to determine the optimal formulation for optimal taste-masking effect. The experiments are conducted by following an experimental-design approach – a useful tool that permits to gain systematically the maximum information with a minimum number of experiments during the early stage of drug development.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pulverised acetaminophen from Cooper (Melun, France); casein sodium salt from bovine milk (sodium caseinate) from Sigma Aldrich (Missouri, USA); refined soybean lecithin from Alfa Aesar (Massachusetts, USA); acetonitrile HPLC grade (99.9%) and triethylamine HPLC grade (99.9%) from Fischer Chemical (Leicestershire, England);

phosphoric acid powder analytical grade (99.9%) from Merck (Darmstadt, Germany). The materials were used as received.

## **2.2. Methods**

### **2.2.1. Spray-drying experiment**

The feed dispersion was prepared by combining acetaminophen (1%, w/w), sodium caseinate and lecithin in distilled water and stirring overnight before being spray-dried in a Mini Spray Dryer B-190 (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). The spray-dryer equipped with a spray nozzle of 0.5 mm orifice diameter was a co-current model, using compressed air as atomizing and drying air. The feed rate was set at 4 mL/min with maximum aspiration. The quantity of sodium caseinate and lecithin in the feed dispersion, the inlet temperature and the spray flow of spray-drying were defined by experimental design as described further. The spray-dried powders were stored at 20°C and 12%RH before analysis.

### **2.2.2. Determination of the drug content**

A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug was completely dissolved in distilled water and analyzed by HPLC in order to determine the drug content in the spray-dried powders. The analysis was performed on six replicates. The average content in drug were calculated.

### **2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction**

The particle size distribution of spray-dried powder was measured by a Mastersizer S (Malvern Instruments, Orsay, France) using a 300mm lens. The sample was dispersed in the dry state with compressed air at 4 bars by a powder feeder.

### **2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM)**

The morphology of spray-dried particles was visualized by a Hitachi S4700 apparatus (Tokyo, Japan) operating at an accelerating voltage of 3 kV. The micrographs were taken from the powder surface previously coated with carbon.

### **2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)**

The experiment was performed on a DSC 1 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Samples were placed into non-hermetic aluminium pans and heated from 25 to 250°C at 10°C/min under a nitrogen purge. The reference was an empty aluminium pan. Temperature and enthalpy readings were calibrated using pure indium and zinc.

### **2.2.6. *In vitro* drug release measurements**

The experiment was performed on a continuous flow system as previously described in our study [20]. A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug was placed in an unpacked Omega column tube (4.6 mm x 5 cm) fitted with 0.5  $\mu$ m frits and connected with 1.6 mm o.d. tubing at each end. The column assembly, frits and tubing consisted in PEEK polymer were purchased from Upchurch Scientific (Washington, US). The phosphate buffer saline pH 7.4 (European Pharmacopeia 7.5) was supplied to the column inlet at 1 mL/min by a PhD 2000 syringe pump (Havard Apparatus, Massachusetts, US) that simulates the stimulation rate of saliva in human [21]. Heating (37°C) of the column was achieved using a column heater. Sampling was carried out by collecting the solution at the outlet of tubing at different time points: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes. The released quantity of drug was then determined by HPLC. The release study was also performed with the pure drug for comparison.

In order to examine the drug release behavior of taste-masked formulation in the gastric conditions, a quantity of powder equivalent to 10 mg of drug was put into 10 mL solution of hydrochloric acid pH 1.0 (European Pharmacopeia 7.5) under sink conditions. The flask was horizontally shaken at 37°C (80 rpm, GFL 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Germany) during 45 minutes. The released amount in the medium was then determined by HPLC. The experiment was carried out in triplicate.

### **2.2.7. HPLC analysis**

The HPLC system was equipped with a ProStar 230 pump, a ProStar 410 auto-sampler, a ProStar 325 UV-Vis detector (Varian Inc., Les Ulis, France). The separation was performed on a Synergi Hydro-RP column (4  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm i.d.) (Phenomenex Inc., Le Pecq, France). The column temperature was maintained at 30°C. The mobile phase was a mixture (16:84 v/v) of acetonitrile and an aqueous phosphate buffer containing monobasic potassium phosphate (20mM), triethylamine (0.2 mL/L) and adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid solution (3N). The flow rate was 1.0 mL/min and the injection volume was 15  $\mu$ L. The effluent peak was monitored at 243 nm. Chromatographic data were acquired by Galaxie Software.

### **2.2.8. Data analysis**

Statistical and graphical analysis of data were carried out using the StatGraphics Centurion XV.II software (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Assumed encapsulating mechanism

In this study, we postulate that, a droplet in the drying chamber can be divided into a liquid core phase, an intermediate region and a liquid-air interface in outermost layer. The droplet is composed of water, solute (drug) and surface-active components (sodium caseinate and lecithin). During drying, the evaporation at the liquid-air interface drives water moving to the surface for removal. The evaporation occurring in the intermediate region may be more rapid than the mass transport of water so that the concentration of solute strongly increases. It causes the diffusion of the latter inwards the core. The diffusion of sodium caseinate and lecithin may also occur. Simultaneously, the surface affinity force pushes them towards the liquid-air interface which is a diffusion-limited process. Due to high molecular weight, the diffusion of sodium caseinate and lecithin inwards the core is reduced. Their concentration in the intermediate region therefore favors the migration towards the surface as the liquid-air interface renews after complete drying of the outer layer. Hereby, spray-dried particle consists in a multilayer of surface-active components forming the coating and encapsulated drug in the core (Figure II-1).

#### 3.2. Screening study by a $2^4$ factorial design

**Table II-1:** Experimental levels of input variables.

Input variable	Code	Unit	Low level	High level
Inlet temperature	X <sub>1</sub>	°C	130	150
Spray flow	X <sub>2</sub>	L/h	300	600
Sodium caseinate amount*	X <sub>3</sub>	%	1.0	5.0
Lecithin amount*	X <sub>4</sub>	%	0.5	1.5

\*interpreted as the percentage (w/w) in the dispersion being spray-dried.

In the first instance, a factorial design is used in an attempt to screen for the experimental variables and interactions that have significant influence on the investigated response. Based on findings from the literature, the processing and formulation parameters defined as input variables are inlet temperature (X<sub>1</sub>), spray flow (X<sub>2</sub>), sodium caseinate amount (X<sub>3</sub>) and lecithin amount (X<sub>4</sub>). Each variable is fixed at one of two levels, i.e. low and high levels that are presented in Table II-1. The taste-masking effect translated into the percentage of released amount of drug during the first two minutes is considered as the response (Y). Indeed, taste-masking is achieved if, within the frame of 1 – 2 minutes, drug

substance is either not released or the released amount is below the human threshold for identifying its bad taste. Sixteen runs are hence generated by a  $2^4$ -full factorial design.

**Table II-2: Experimental conditions determined by  $2^4$ -factorial design and the result data of 16 runs.**

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y*	Drug content	D <sub>50</sub> **
	°C	L/h	%	%	%	%	µm
1	130	300	1.0	0.5	20.10	40.3 ± 0.3	5.25
2	150	300	1.0	0.5	22.27	41.0 ± 0.3	5.95
3	130	600	1.0	0.5	21.37	40.4 ± 0.2	4.96
4	150	600	1.0	0.5	18.79	41.0 ± 0.9	6.84
5	130	300	5.0	0.5	10.62	14.8 ± 0.2	9.69
6	150	300	5.0	0.5	17.24	15.2 ± 0.3	9.06
7	130	600	5.0	0.5	14.27	15.6 ± 0.1	5.75
8	150	600	5.0	0.5	17.89	15.7 ± 0.1	6.88
9	130	300	1.0	1.5	7.91	29.4 ± 0.6	5.98
10	150	300	1.0	1.5	7.36	29.0 ± 0.3	7.50
11	130	600	1.0	1.5	9.25	28.7 ± 0.2	4.51
12	150	600	1.0	1.5	9.41	31.3 ± 0.5	5.38
13	130	300	5.0	1.5	11.56	13.4 ± 0.1	7.23
14	150	300	5.0	1.5	12.99	13.6 ± 0.1	7.79
15	130	600	5.0	1.5	13.00	13.5 ± 0.1	4.74
16	150	600	5.0	1.5	13.29	13.7 ± 0.1	5.52

\* the response representing the percentage of released amount of drug during the first two minutes measured by drug release study.

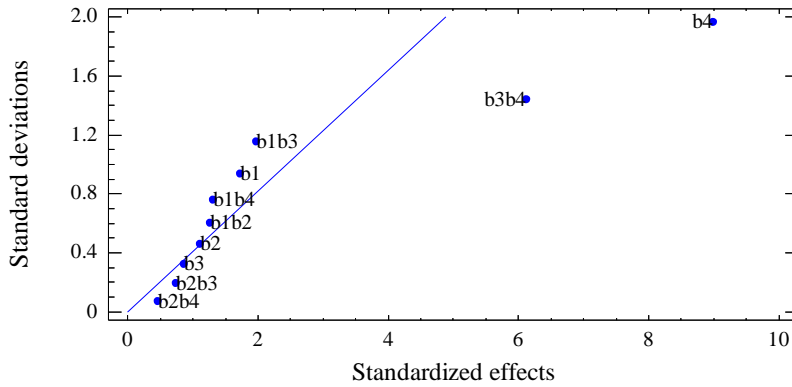
\*\* mass median diameter measured by laser diffraction.

As shown in Table II-2, the percentage of released amount ranges from 7.36% to 22.27%. It indicates that the investigated response is clearly dependent on the input variables. A polynomial model including linear and second-order interactions that correlates the input variables and the response is described by the Equation (1):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 \quad (1)$$

where  $b_0$  is the arithmetic mean response of the sixteen runs;  $b_1$  to  $b_4$  are the estimated coefficients for  $X_1$  to  $X_4$ , respectively; and  $b_{12}$  to  $b_{34}$  are the estimated coefficients for interaction terms. The model evaluates, on the one hand, the main effects of input variables

( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  and  $X_4$ ) that represent the average results of changing one variable at a time from its low to high level; on the other hand, the interactions terms ( $X_iX_j$ ) showing how the response changes when two variables are simultaneously changed. Higher order interactions, being supposed to be negligible, are not considered by the model.



**Figure II-2:** Half-normal probability plot of estimated effects.

Estimated effects of all terms in the model are calculated and displayed on the half-normal probability plot in Figure II-2. This is a helpful tool in identifying significant effects for saturated design without repetition. The coefficient that deviates from the normal distribution represents an influential variable, the coefficient fitting the straight line means that in the experimental domain, the corresponding variable does not influence the response [22], [23]. As can be seen in Figure II-2, coefficients  $b_4$  and  $b_{3b_4}$  exhibit the greatest deviations from the straight line. That is to say the lecithin amount ( $X_4$ ) and the sodium caseinate amount ( $X_3$ ) in the presence of lecithin (explaining for the interaction term  $X_3X_4$ ) has a significant influence on the percentage of released amount of drug ( $Y$ ). Two main effects of the inlet temperature ( $X_1$ ) and the spray flow ( $X_2$ ) as well as other interactions are shown to have a mediocre or no influence on the response. For this reason, these interactions are excluded in the refined model. Despite the mediocre effect of  $X_1$  and  $X_2$ , these two variables are included in the refined model that helps to identify the optimal conditions for these variables. So that, the Equation (1) can be rewritten as below:

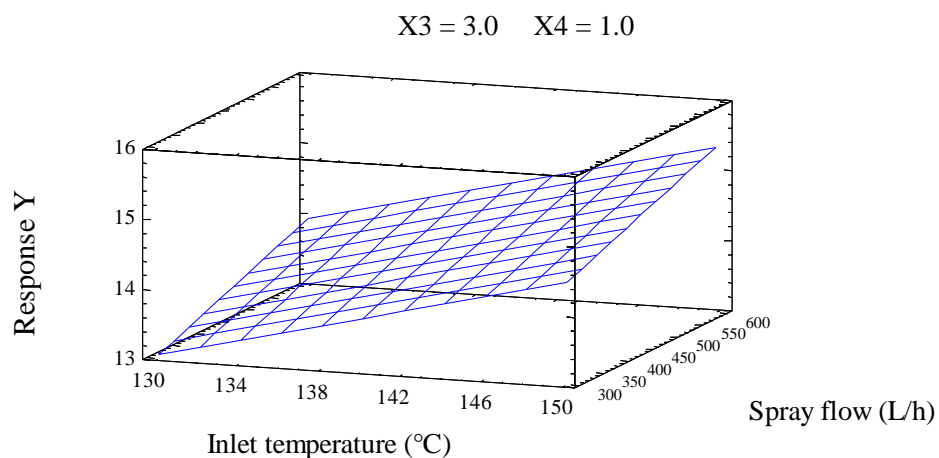
$$Y = 18.228 + 0.070X_1 + 0.003X_2 - 2.693X_3 - 14.614X_4 + 2.464X_3X_4 \quad (2)$$

The model as fitted explains 90.4% of the variability in the response  $Y$  and can suitably describe the relationship between the percentage of released amount during the first two

minutes and the input variables, i.e. inlet temperature, spray flow, sodium caseinate amount and lecithin amount, in the experimental domain. The magnitude and direction of the estimated coefficient explains the nature of the variable effect. For example, the variable with coefficient of greater magnitude shows a higher influence on the response. On the other hand, a variable with a positive coefficient positively correlates to the response and inversely if the coefficient is negative.

### 3.2.1. Influence of inlet temperature ( $X_1$ ), spray flow ( $X_2$ ) and their optimal conditions

The inlet temperature ( $b_1 = +0.070$ ) and the spray flow ( $b_2 = +0.003$ ) are shown to be directly proportional to the response. It means that increasing the inlet temperature and/or the spray flow will increase the percentage of released amount of drug during the first two minutes (Figure II-3). Indeed, a higher temperature results in higher drying rate, the particle is dried and formed very quickly. The component segregation may be interrupted before a sufficient coating formation and drug released amount is more important. Moreover, as it can be seen in Table II-2, higher spray flow seems to produce smaller particle size because of increased shear force so that the release of drug increases. These variables have only marginal effects in the investigated experimental domain as their estimated coefficients get relatively low values. The inlet temperature and the spray flow are therefore set at 130 °C and 300 L/h respectively for further optimization since these conditions produced the optimal response (Figure II-3).

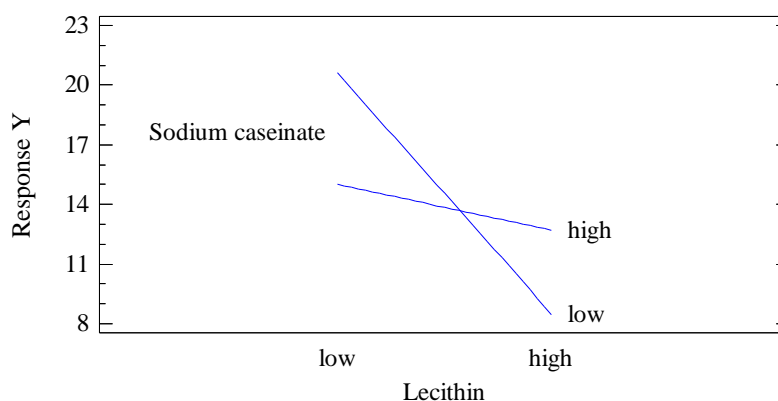


**Figure II-3:** Response surface plot for the response Y as a function of inlet temperature and spray flow when the sodium caseinate amount ( $X_3$ ) and the lecithin amount ( $X_4$ ) are maintained at their middle level.



### 3.2.2. Influence of sodium caseinate amount ( $X_3$ ), lecithin amount ( $X_4$ ) and their interaction

The sodium caseinate amount and the lecithin amount are shown to decrease the percentage of released amount of drug during the first two minutes since the estimated coefficients are negative i.e.  $b_3 = -2.639$  and  $b_4 = -14.614$ , respectively. Interestingly, these two variables are demonstrated to “interact”. It means that the influence of one variable on the response is different when considering different levels of the second variable. As shown in Figure II-4, at the low level of the sodium caseinate amount, the response Y considerably decreases as the lecithin amount goes from low to high level. At higher level of the sodium caseinate amount, this decrease is less pronounced. Chen et al. suggest that, regarding the multicomponent segregation, the diffusivity of individual component should take into account the viscosity of the droplet during drying [19]. The intermediate region becomes highly viscous due to moisture removal so that the components will move rather slowly. It may be the case for high level of sodium caseinate amount. In addition, the higher solid concentration in this case favors the crust formation mechanism, the occurrence of segregation may be less obvious. That is to say, the coating build-up is not sufficient to delay the releases of drug during the early time.



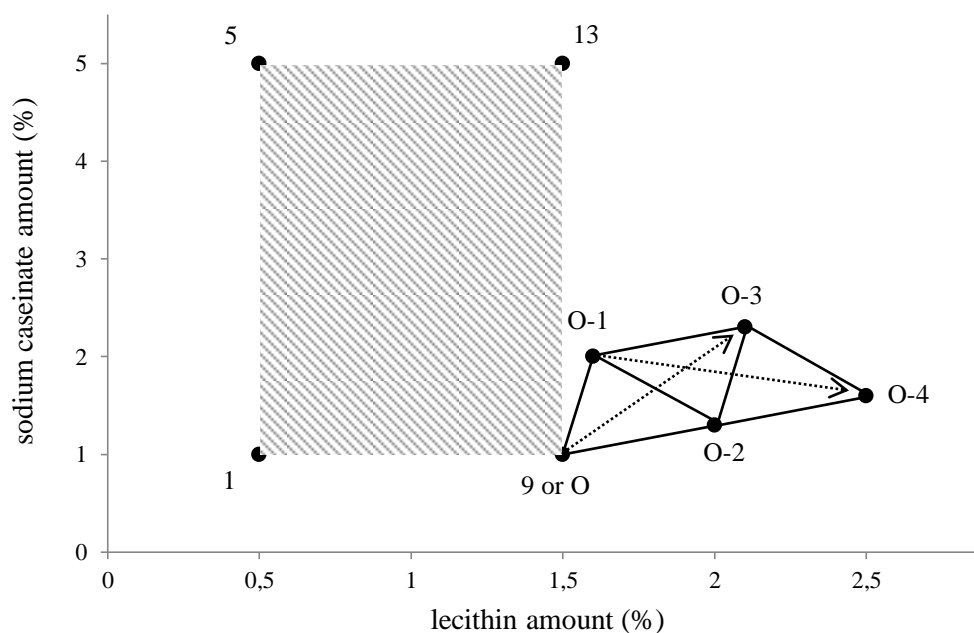
**Figure II-4:** Interaction plot between sodium caseinate amount and lecithin amount for the response Y as the inlet temperature and the spray flow are maintained at their middle level.

The optimal conditions within the investigated experimental domain are therefore determined as 1% (w/v) of sodium caseinate and 1% (w/v) of lecithin.

### 3.3. Optimization by simplex design

#### 3.3.1. Algorithm of simplex approach

Simplex design is a step-wise strategy for optimization that can adjust multiple variables simultaneously to rapidly achieve the optimal response. A simplex is a geometric figure of  $k + 1$  vertices or experiments, wherein  $k$  is the number of variable being optimized, e.g. the simplex is a line for optimizing a single variable, a triangle for two variables, a tetrahedron for three variables, etc. The basic rule of simplex algorithm is to displace the simplex primarily towards the more favorable conditions. Each step consists of performing the experimental conditions determined by the simplex. The vertex that produces the least favorable response is rejected by reflection into the opposite direction. A new simplex is therefore created including the new vertex and the old ones. The procedure is repeated until the optimal conditions are achieved (Figure II-5).



**Figure II-5:** Graphical illustration of simplex optimization of two variables from this study. The shaded area represents the experimental domain investigated by factorial design (section 3.2). The simplex approach allows exploring the optimal conditions in the vicinity of the best conditions given by factorial design.

#### 3.3.2. Optimal formulation

In this study, the simplex approach is used in order to determine the optimal formulation for optimal taste-masking efficiency. Concretely, the purpose is to minimize the percentage of released amount of acetaminophen during the first two minutes. Indeed, the lower the released amount, the better the taste-masking effect. Given that the sodium caseinate

amount and the lecithin amount have the most influential effects on the response, these two variables need to be optimized ( $k = 2$ ). The experimental conditions that give the best response in the screening design are used as a first vertex of the starting simplex, denoted O. The inlet temperature and the spray flow are set constantly at 130 °C and 300 L/h respectively. Calculating the set of value for each vertex in the simplex can be referred to [24]. Four additional experiments are performed and reported in Table II-3. The experiment denoted O-4 is shown to generate the best response, in other words, the lowest percentage of released amount of acetaminophen i.e. 4.15% in comparison to 7.91% before optimization. The optimal formulation containing 20.2% (w/w) in drug has a quite small particle size with mass median diameter of 7.45  $\mu\text{m}$ .

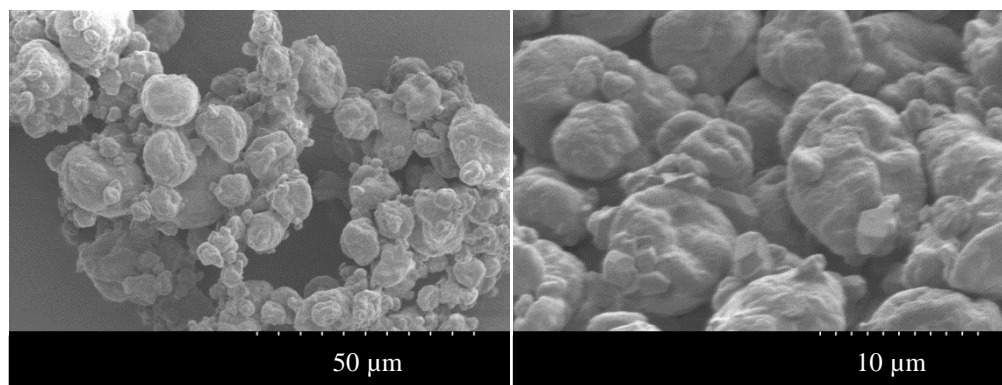
**Table II-3: Experimental conditions determined by simplex design and the result data.**

	O	O-1	O-2	O-3	O-4
Sodium caseinate amount (%) <sup>*</sup>	1.0	2.0	1.3	2.3	1.6
Lecithin amount (%) <sup>*</sup>	1.5	1.6	2.0	2.1	2.5
Released amount at t = 2 min (%)	7.91	6.89	6.33	7.28	4.15
Drug content (%)	29.4	22.6	24.5	21.1	20.2
D <sub>50</sub> ( $\mu\text{m}$ ) <sup>**</sup>	5.98	7.08	7.44	7.25	7.45

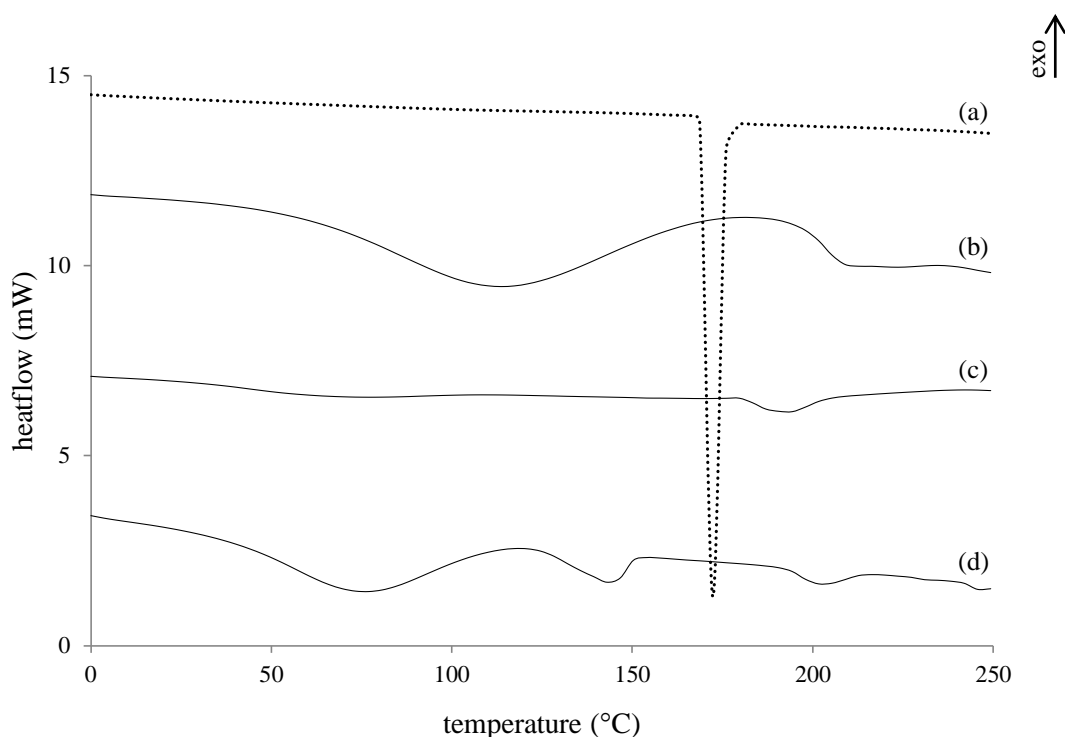
<sup>\*</sup>interpreted as the percentage (w/w) in the dispersion being spray-dried.

<sup>\*\*</sup>mass median diameter measured by laser diffraction.

The SEM micrographs in Figure II-6 show the tendency of particles to form aggregates. Figure II-7 displays the DSC patterns of pure drug, sodium caseinate, lecithin and the spray-dried powder prepared under the optimal conditions. The first large endotherm peak close to 100°C of spray-dried powder corresponds to the loss in moisture. The second small peak onset at 121.7°C can be attributed to the fusion of crystallized drug. As can be seen in Figure II-6, a few crystals are present as isolate particles with a reduced size, that results in decreasing the temperature of fusion in comparison to the initial drug particle having 50  $\mu\text{m}$  in median diameter [25]. We suggest that the formation of these crystals may be due to the formation of very fine droplets during atomization so that no segregation and no coating can occur due to relatively quick drying and drug afterwards crystallizes. Importantly, no drug crystal can be observed on the particle surface. It means that drug seems mostly to be well encapsulated under these conditions.



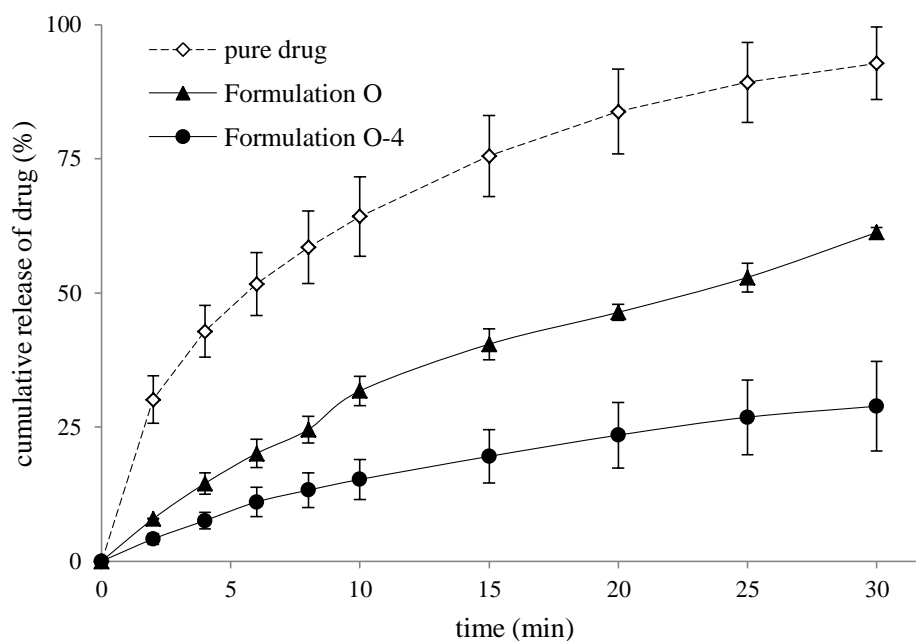
**Figure II-6:** SEM micrographs of spray-dried particles obtained by the optimal formulation.



**Figure II-7:** DSC patterns of (a) pure drug, (b) sodium caseinate, (c) lecithin and (d) spray-dried powder prepared under the optimal conditions.

Figure II-8 displays the drug release profiles of pure drug, the Formulation O and the optimal formulation denoted O-4. It is demonstrated that, the optimal formulation exhibits the lowest percentage of released amount of drug during the first two minutes, i.e. 1.9-fold and interestingly 7-fold less than the Formulation O and the uncoated drug respectively. The optimal formulation seems to delay furthermore the drug release since the released amount is only 28.9% after 30 minutes. Another release study performed in the HCl pH 1.0 reveals that about 96.5% of drug is released after 45 minutes. It can therefore ensure the complete dissolution in the stomach. That is to say the optimal formulation is successfully

achieved and that it performs the best taste-masking effects and do not alter the bioavailability upon administration.



**Figure II-8:** Drug release profiles as a function of time of pure drug, the Formulation O and the optimal formulation denoted O-4 studied by continuous flow system.

#### 4. Conclusion

The multicomponent segregation during spray-drying was suggested to enable the drug encapsulation, and hence to delay the drug release within the mouth during the early time. In this study, the effects of various processing and formulation parameters i.e. inlet temperature, spray flow, sodium caseinate amount and lecithin amount on this process and thus affecting the taste-masking efficiency were investigated. A  $2^4$ -full factorial design was applied and allowed screening for the most influential variables, including sodium caseinate amount and lecithin amount. Optimizing these two variables was therefore conducted by the simplex approach. The characterization of spray-dried powder prepared under optimal conditions showed that the drug seemed mostly to be well encapsulated. The drug release during the first two minutes significantly decreased, 7-fold less than the unmasked drug particles. The optimal formulation was successfully achieved which performed the best taste-masking efficiency and could not alter the bioavailability upon administration.

## References

- [1] A. Columbano, G. Buckton, and P. Wikeley, “Characterisation of surface modified salbutamol sulphate-alkylpolyglycoside microparticles prepared by spray drying,” *Int J Pharm*, vol. 253, no. 1–2, pp. 61–70, 2003.
- [2] B. B. C. Youan, “Microencapsulation of superoxide dismutase into biodegradable microparticles by spray-drying,” *Drug Deliv*, vol. 11, no. 3, pp. 209–214, 2004.
- [3] M. D. Blanco, R. L. Sastre, C. Teijón, R. Olmo, and J. M. Teijón, “5-Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release,” *J Microencapsul*, vol. 22, no. 6, pp. 671–682, 2005.
- [4] J. Elversson and A. Millqvist-Fureby, “In situ coating - An approach for particle modification and encapsulation of proteins during spray-drying,” *Int J Pharm*, vol. 323, no. 1–2, pp. 52–63, 2006.
- [5] C. Vega, H. Douglas Goff, and Y. H. Roos, “Casein molecular assembly affects the properties of milk fat emulsions encapsulated in lactose or trehalose matrices,” *Int. Dairy J.*, vol. 17, no. 6, pp. 683–695, 2007.
- [6] E. H. J. Kim, “Surface composition of industrial spray-dried dairy powders and its formation mechanisms,” Thesis, University of Auckland, Auckland, New Zealand, 2008.
- [7] B. Baras, M. A. Benoit, and J. Gillard, “Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(D,L-lactide) microparticles,” *Int J Pharm*, vol. 200, no. 1, pp. 133–145, 2000.
- [8] Y. J. Fu, F. L. Mi, T. B. Wong, and S. S. Shyu, “Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (D,L-lactide) microparticles prepared by spray drying technique,” *J Microencapsul*, vol. 18, no. 6, pp. 733–747, 2001.
- [9] S. Danviriyakul, D. J. McClements, E. Decker, W. W. Nawar, and P. Chinachoti, “Physical stability of spray-dried milk fat emulsion as affected by emulsifiers and processing conditions,” *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 6, pp. 2183–2189, 2002.
- [10] F. J. Wang and C. H. Wang, “Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres,” *J Microencapsul*, vol. 19, no. 4, pp. 495–510, 2002.
- [11] J. J. Nijdam and T. A. G. Langrish, “The effect of surface composition on the functional properties of milk powders,” *J Food Eng*, vol. 77, no. 4, pp. 919–925, 2006.
- [12] R. P. Raffin, D. S. Jornada, M. I. Ré, A. Pohlmann, and S. S. Guterres, “Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation,” *Int J Pharm*, vol. 324, no. 1, pp. 10–18, 2006.
- [13] A. L. Rattes and W. P. Oliveira, “Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles,” *Powder technology*, vol. 171, no. 1, pp. 7–14, 2007.
- [14] C. Gaiani, M. Morand, C. Sanchez, E. A. Tehrany, M. Jacquot, P. Schuck, R. Jeantet, and J. Scher, “How surface composition of high milk proteins powders is influenced

- by spray-drying temperature,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 377–384, 2010.
- [15] C. Gaiani, M. Mullet, E. Arab-Tehrany, M. Jacquot, C. Perroud, A. Renard, and J. Scher, “Milk proteins differentiation and competitive adsorption during spray-drying,” *Food Hydrocoll*, vol. 25, no. 5, pp. 983–990, 2011.
- [16] G. Meerdink and K. Van’t Riet, “Modeling segregation of solute material during drying of liquid foods,” *AIChE J*, vol. 41, no. 3, pp. 732–736, 1995.
- [17] R. Vehring, W. R. Foss, and D. Lechuga-Ballesteros, “Particle formation in spray-drying,” *J Aerosol Sci*, vol. 38, no. 7, pp. 728–746, 2007.
- [18] S. Wang and T. Langrish, “A review of process simulations and the use of additives in spray drying,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 1, pp. 13–25, 2009.
- [19] X. D. Chen, H. Sidhu, and M. Nelson, “Theoretical probing of the phenomenon of the formation of the outermost surface layer of a multi-component particle, and the surface chemical composition after the rapid removal of water in spray drying,” *Chem Eng Sci*, vol. 66, no. 24, pp. 6375–6384, 2011.
- [20] T. H. Hoang Thi, S. Morel, F. Ayouni, and M. P. Flament, “Development and evaluation of taste-masked drug for paediatric medicines – Application to acetaminophen,” *Int J Pharm*, vol. 434, no. 1–2, pp. 235–242, 2012.
- [21] A. Preetha and B. Banerjee, “Comparison of artificial saliva substitutes,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 18, no. 2, pp. 178–186, 2005.
- [22] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, and R. Bergman, “Experimental design and optimization,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 42, no. 1–2, pp. 3–40, 1998.
- [23] B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, “Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 56, no. 2, pp. 141–158, 2011.
- [24] F. H. Walters, L. R. P. Jr, S. L. Morgan, and S. N. Deming, *Sequential simplex optimization - A technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing*, First ed. Florida, USA: CRC Press, 1991.
- [25] Y. Shibuta and T. Suzuki, “Melting and solidification point of fcc-metal nanoparticles with respect to particle size: A molecular dynamics study,” *Chem Phys Lett*, vol. 498, no. 4–6, pp. 323–327, 2010.

### **CHAPITRE III**

**Utilisation du caséinate de calcium en association avec la  
lécithine dans le masquage de goût de l'acétaminophène.  
Etude comparative avec le caséinate de sodium**

(Projet de publication)



# USE OF CALCIUM CASEINATE IN ASSOCIATION WITH LECITHIN FOR MASKING THE BITTERNESS OF ACETAMINOPHEN – COMPARATIVE STUDY WITH SODIUM CASEINATE

Thanh Huong Hoang Thi<sup>1,2</sup>, Mohamed Lemdani<sup>1,3</sup>, Marie-Pierre Flament<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Université Lille Nord de France, College of Pharmacy, Lille, France*

<sup>2</sup>*INSERM U1008 Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France*

<sup>3</sup>*Laboratoire de Biomathématique, College of Pharmacy, EA 2694, Lille, France*

## **Abstract**

Owing to a variety of structural and functional properties, milk proteins are readily studied for food and pharmaceutical applications. In the present study, calcium caseinate in combination with lecithin was investigated to encapsulate the acetaminophen through spray-drying for taste-masking purpose. A 2<sup>4</sup>-full factorial design revealed that the spray flow, the calcium caseinate amount and the lecithin amount had significant influence on the release of drug during the first two minutes. Indeed, increasing the spray flow and the calcium caseinate amount increased the released amount, whereas increasing the lecithin amount decreased the released amount. The “interaction” between calcium caseinate amount and lecithin amount was also shown to be statistically significant. The second objective was to compare two types of caseinate-based formulations. The characteristics of spray-dried formulations determined by SEM and DSC were shown to depend on the proportion of caseinate/lecithin rather than the type of caseinate, i.e. sodium or calcium caseinate. Interestingly, calcium caseinate-based formulations were found to lower the released amount of drug during the early time to a higher extent than sodium caseinate-based formulations, which indicates better taste masking efficiency.

**Keywords:** Taste-masking, Spray-drying, Calcium caseinate, Sodium caseinate

---

\* *To whom correspondence should be addressed.*

*Tel:* +33 3 20964040 *Fax:* +33 3 20959009

*Email:* marie-pierre.flament@univ-lille2.fr

## 1. Introduction

Milk proteins are widely available, inexpensive, natural and GRAS (generally recognized as safe) materials with high nutritional value and good sensory properties. Owing to many structural and functional properties, e.g. binding capacity to a variety of molecules, surface activity, self-assembly and co-assembly, gelation and film formation, biodegradability, they hold promise for bioactive delivery systems in many food and pharmaceutical applications, as recently reviewed by [1–5]. Particularly, the surface activity combined with the film forming properties make milk proteins good candidates as coating materials for bioactive encapsulation via spray-drying [6]. Hereby, the proteins being surface-active preferentially accumulate at the air-liquid interface. The proteins matrix is subsequently formed on the outermost surface upon drying as the extended peptide chains associate through intermolecular hydrogen and electrostatic bonds, hydrophobic interactions, etc. Depending on the proteins, manufacturing process and secondary treatment, the protein matrix properties can be modulated for extensive purposes, for example, in order to sustain the release of drug by glutaraldehyde-crosslinked casein microspheres [7], glyceraldehyde-crosslinked casein beads [8], thermally induced crosslinking of casein film [9], genipin-crosslinked casein hydrogel [10], transglutaminase-crosslinked casein hydrogel [11],  $\text{Ca}^{2+}$ -induced crosslinking of casein film [12].

Caseins are phosphorylated proteins representing about 80% of the total nitrogen content in bovine milk, which comprise four principal primary proteins:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in the approximate ratio of 40:10:35:12 by weight respectively. The casein fractions differ from each other by the amino acid content, the distribution of charge within the molecule, the metal binding capacity and the hydrophobicity that can be summarized in Table III-1 [13], [14]. Commercial caseins are commonly found in the form of caseinate salts that are prepared by denaturation of the casein micellar structure in the native milk. Indeed, precipitation of casein is achieved by acidification of skim milk to the isoelectric point pH 4.6. Precipitated caseins are insoluble in water. Further treatment with an alkali solution to pH 6.7 cause the acid casein coagulum to dissolve and to form more soluble caseinate salts, e.g. addition of sodium hydroxide yields the sodium caseinate and calcium hydroxide yields the calcium caseinate.

The aim of the present study is to investigate the use of calcium caseinate in association with lecithin for encapsulating the acetaminophen through spray-drying and therefore

masking the bitterness of drug. Taste assessment was approached *in vitro* by an indirect method through drug release study. Indeed, taste-masking is achieved if, within the frame of 1 – 2 minutes, drug substance is either not released or the released amount is below the human threshold for identifying its bad taste. The effects of processing and formulation variables, i.e. inlet temperature, spray flow, calcium caseinate amount and lecithin amount, on the percentage of released amount of drug during the first two minutes were evaluated using a 2<sup>4</sup>-full factorial design. Spray-dried particles based on calcium caseinate were characterized by various techniques e.g. scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, and compared to spray-dried particles based on sodium caseinate for their effectiveness in taste-masking.

**Table III-1: Properties of casein fractions (from [15]).**

	$\alpha_{s1}$ -casein	$\alpha_{s2}$ -casein	$\beta$ -casein	$\kappa$ -casein
Molecular weight (kDa)	23.64	25.23	23.98	19.02
Residues/molecules				
amino acids	199	207	209	169
proline	17	10	35	20
cysteine	0	2	0	2
-S-S-	0	?	0	?
phosphor-	8	11	5	1
carbohydrate	0	0	0	+
Hydrophobicity (kJ/res)	4.9	4.7	5.6	5.1
Charge				
mol % residues	34	36	23	21
net charge/residue	-0.10	-0.07	-0.06	-0.02
distribution	uneven	uneven	very uneven	very uneven

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pulverised acetaminophen from Cooper (Melun, France); spray-dried calcium caseinate kindly gifted by DMV International (Veghel, The Netherlands); refined soybean lecithin from Alfa Aesar (Massachusetts, USA); acetonitrile HPLC grade (99.9%) and triethylamine HPLC grade (99.9%) from Fischer Chemical (Leicestershire, England); phosphoric acid powder analytical grade (99.9%) from Merck (Darmstadt, Germany). The materials were used as received.

## **2.2. Methods**

### **2.2.1. Spray-drying experiment**

The feed dispersion was made by combining acetaminophen (1%, w/w), calcium caseinate and lecithin in distilled water and stirring overnight before being spray-dried in a Mini Spray Dryer B-190 (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). The spray-dryer equipped with a spray nozzle of 0.5 mm orifice diameter was a co-current model, using compressed air as atomizing and drying air. The feed rate was set at 4 mL/min with maximum aspiration. The quantity of calcium caseinate and lecithin in the feed dispersion, the inlet temperature and the spray flow of spray-drying were defined according to an experimental design as described further. The spray-dried powders were stored at 20°C and 12%RH before analysis.

### **2.2.2. Determination of the drug content**

A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug was completely dissolved in distilled water and was analyzed by HPLC in order to determine the drug content in the spray-dried powders. The analysis was performed on six replicates in order to calculate the average content in drug.

### **2.2.3. Particle size distribution by laser diffraction**

The particle size distribution of spray-dried powder was measured by a Mastersizer S (Malvern Instruments, Orsay, France) using a 300mm lens. The sample was dispersed in the dry state with compressed air at 4 bars by a powder feeder.

### **2.2.4. Scanning electronic microscopy (SEM)**

The morphology of spray-dried particle was visualized by a Hitachi S4700 apparatus (Tokyo, Japan) being operated at an accelerating voltage of 3 kV. The micrographs were taken from the powder surface previously coated with carbon.

### **2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)**

The experiment was performed on a DSC 1 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Samples were placed into non-hermetic aluminum pans and were heated from 25 to 250°C at 10°C/min under a nitrogen purge. The reference was an empty aluminum pan. Temperature and enthalpy readings were calibrated using pure indium and zinc.

### **2.2.6. *In vitro* drug release measurements**

The experiment was performed on a continuous flow system as previously described in our study [16]. A quantity of powder equivalent to 10 mg of drug were placed in an unpacked Omega column tube (4.6 mm x 5 cm) fitted with 0.5  $\mu$ m frits and connected with 1.6 mm o.d. tubing at each end. The column assembly, frits and tubing consisted of PEEK polymer were purchased from Upchurch Scientific (Washington, US). The phosphate buffer saline pH 7.4 (European Pharmacopeia 7.5) was supplied to the column inlet at 1 mL/min by a PhD 2000 syringe pump (Havard Apparatus, Massachusetts, US) that simulates the stimulation rate of saliva in human [17]. Heating (37°C) of the column was achieved using a column heater. Sampling was carried out by collecting the solution at the outlet of tubing at different time points: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes. The released quantity of drug was then determined by HPLC. The release study was also performed with the pure drug for comparison.

In order to examine the drug release behavior of taste-masked formulation in the gastric conditions, a quantity of powder equivalent to 10 mg of drug were put into 10 mL solution of hydrochloric acid pH 1.0 (European Pharmacopeia 7.5) under sink conditions. The flask were horizontally shaken at 37°C (80 rpm, GFL 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Germany) during 45 minutes. The released amount in the medium was then determined by HPLC. The experiment was carried out in triplicate.

### **2.2.7. HPLC analysis**

The HPLC system was equipped with a ProStar 230 pump, a ProStar 410 auto-sampler, a ProStar 325 UV-Vis detector (Varian Inc., Les Ulis, France). The separation was performed on a Synergi Hydro-RP column (4  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm i.d.) (Phenomenex Inc., Le Pecq, France). The column temperature was maintained at 30°C. The mobile phase was a mixture (16:84 v/v) of acetonitrile and an aqueous phosphate buffer containing monobasic potassium phosphate (20mM), triethylamine (0.2 mL/L) and adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid solution (3N). The flow rate was 1.0 mL/min and the injection volume was 15  $\mu$ L. The effluent peak was monitored at 243 nm. Chromatographic data were acquired by Galaxie Software.

### **2.2.8. Data analysis**

Statistical and graphical analysis of data were carried out using the StatGraphics Centurion XV.II software (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Use of calcium caseinate for masking the bitterness of acetaminophen

**Table III-2:** Experimental levels of four input variables.

Input variable	Code	Unit	Low level	High level
Inlet temperature	X <sub>1</sub>	°C	130	150
Spray flow	X <sub>2</sub>	L/h	300	600
Calcium caseinate amount *	X <sub>3</sub>	%	1.0	5.0
Lecithin amount *	X <sub>4</sub>	%	0.5	1.5

\*interpreted as the percentage (w/w) in the dispersion being spray-dried.

**Table III-3:** Experimental conditions determined by 2<sup>4</sup>-full factorial design and obtained results.

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y*	Drug content	D <sub>50</sub> **
	°C	L/h	%	%	%	%	µm
1	130	300	1.0	0.5	4.78	35.2 ± 0.1	5.90
2	150	300	1.0	0.5	4.38	41.0 ± 0.8	6.70
3	130	600	1.0	0.5	6.47	39.0 ± 1.4	4.46
4	150	600	1.0	0.5	6.45	39.1 ± 0.7	4.77
5	130	300	5.0	0.5	9.86	15.1 ± 0.8	8.97
6	150	300	5.0	0.5	9.33	15.4 ± 0.2	8.16
7	130	600	5.0	0.5	9.68	14.8 ± 0.6	4.27
8	150	600	5.0	0.5	10.40	15.2 ± 0.2	4.71
9	130	300	1.0	1.5	4.43	29.4 ± 0.6	6.61
10	150	300	1.0	1.5	5.15	29.0 ± 0.3	6.80
11	130	600	1.0	1.5	5.10	28.7 ± 0.2	5.83
12	150	600	1.0	1.5	6.20	31.3 ± 0.5	5.31
13	130	300	5.0	1.5	5.66	13.4 ± 0.1	9.75
14	150	300	5.0	1.5	6.31	13.6 ± 0.1	9.10
15	130	600	5.0	1.5	6.29	13.5 ± 0.1	5.09
16	150	600	5.0	1.5	6.51	13.7 ± 0.1	5.18

\*the response representing the percentage of released amount of drug during the first two minutes measured by drug release study.

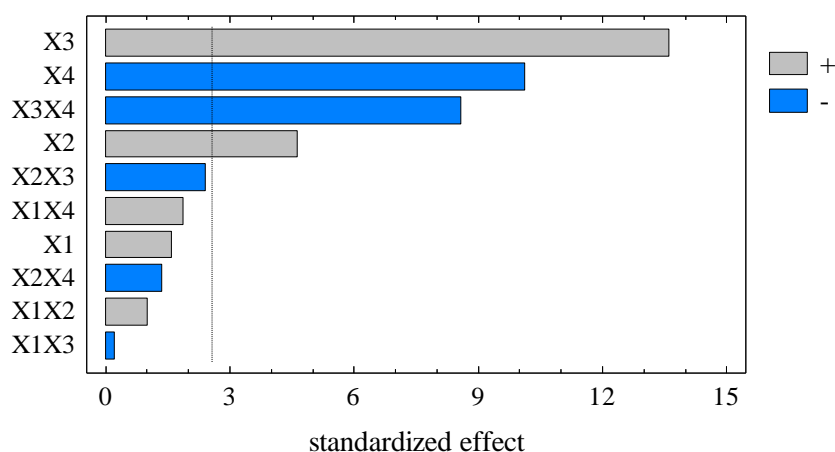
\*\*mass median diameter measured by laser diffraction.

A 2<sup>4</sup>-full factorial design is used in order to evaluate the effects of four processing and formulation parameters, i.e. inlet temperature (X<sub>1</sub>), spray flow (X<sub>2</sub>), calcium caseinate amount (X<sub>3</sub>) and lecithin amount (X<sub>4</sub>), on the response Y, defined as the percentage of

released amount of drug during the first two minutes. Each input variable is fixed at one of two levels that are presented in Table III-2.

Over sixteen runs, the response Y is shown to vary from 4.38 to 10.40%, which indicates that the percentage of released amount during the first two minutes depends on the experimental variables (Table III-3).

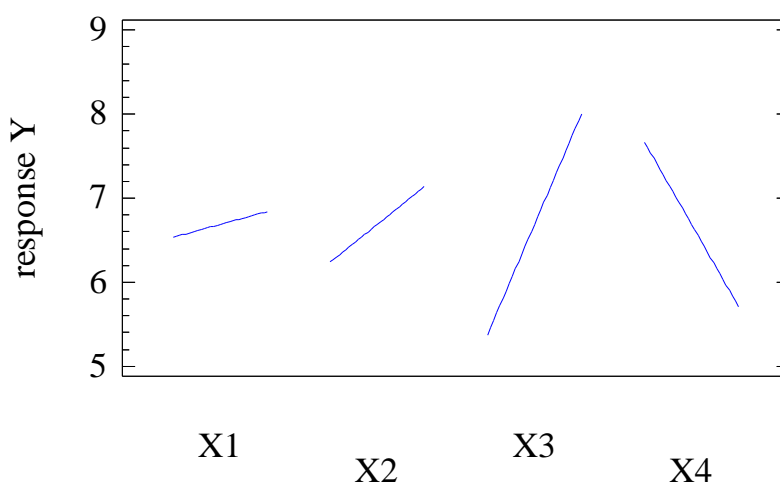
A Pareto chart can be used to identify the input variables that have a significant influence on the investigated response. The plot displays the absolute values of the standardized effects, and a reference line limiting the level of significance, so that any effect that extends beyond the reference line is statistically influential [18]. As can be seen in Figure III-1, the calcium caseinate amount ( $X_3$ ), the lecithin amount ( $X_4$ ) and the spray flow ( $X_2$ ) are shown to be significant variables that influence the response Y. The interaction  $X_3X_4$  also appears to be important in the way that the effect of one variable depends on the level of the other variable.



**Figure III-1:** Standardized Pareto chart of estimated effects for the response Y ( $X_1$ : Inlet temperature,  $X_2$ : Spray flow,  $X_3$ : Calcium caseinate amount and  $X_4$ : Lecithin amount). The standardized effect is equal to the t-value of the Student's t-test and the reference line (dashed line) is drawn through the critical value at 5% significance level.

The main effects plot allows getting more insights about how the experimental variables affect the investigated response, in other words, how the average response changes when the variable varies from its low to high level whilst the others are maintained at middle level. As shown in Figure III-2, when the inlet temperature ( $X_1$ ) increases from 130 to 150°C, the response Y very slightly increases from 6.53 to 6.84%, and this change is not

statistically significant, as confirmed by the Pareto chart. Also increasing the spray flow ( $X_2$ ) and the calcium caseinate amount ( $X_3$ ) from the low to high level are shown to significantly increase the percentage of released amount during the first two minutes, i.e. from 6.24 to 7.14% and 5.37 to 8.01%, respectively. On the other hand, the lecithin amount ( $X_4$ ) is demonstrated to significantly influence on the investigated response by decreasing the released amount from 7.67 to 5.71% whilst increasing from 0.5 to 1.5%.



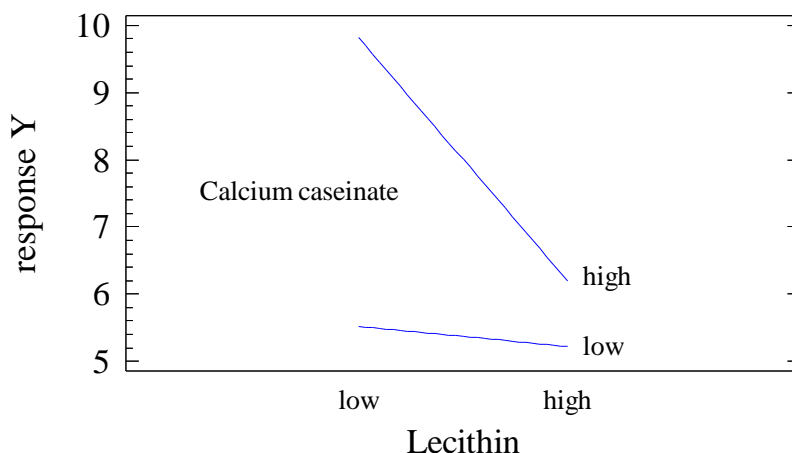
**Figure III-2:** Main effects plot of experimental variables for the response Y ( $X_1$ : Inlet temperature,  $X_2$ : Spray flow,  $X_3$ : Calcium caseinate amount and  $X_4$ : Lecithin amount).

The Pareto chart also reveals the most important interaction  $X_3X_4$  that occurs between the calcium caseinate amount and the lecithin amount. This implies that the effect of lecithin amount on the response Y at two different levels of the calcium caseinate amount is not the same. As can be seen in Figure III-3, at the high level of the calcium caseinate amount, the response Y sharply decreases with increasing the lecithin amount. At the low level of calcium caseinate amount, this change is less obvious. Interestingly, the experiment carried out with the low level of calcium caseinate amount and the high level of lecithin amount generates the lowest response Y.

Briefly, the use of calcium caseinate in association with lecithin is demonstrated to decrease the percentage of the released amount of drug during the first two minutes, therefore it is probably effective in masking the bitterness of acetaminophen, since a small released amount of drug within the mouth that is inferior to the human threshold can suppress the bitter sensation. The  $2^4$ -full factorial design allows identifying the processing and formulation variables that significantly influence the released amount. They include



the spray flow, the calcium caseinate amount and the lecithin amount so that further optimization steps should take into account the effects of these parameters.



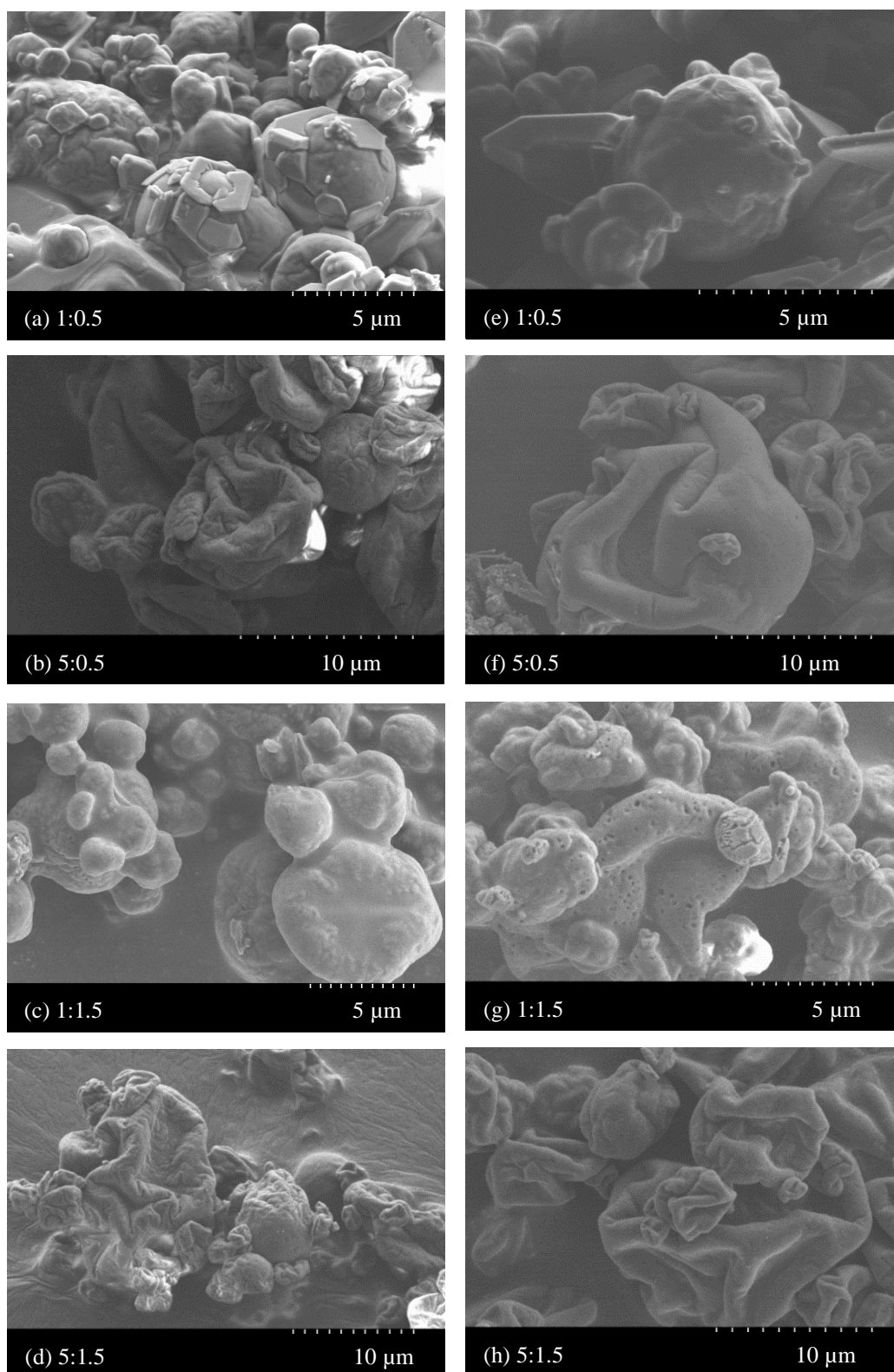
**Figure III-3:** Interaction plot between calcium caseinate amount and lecithin amount for the response Y.

### 3.2. Comparative study between sodium caseinate and calcium caseinate

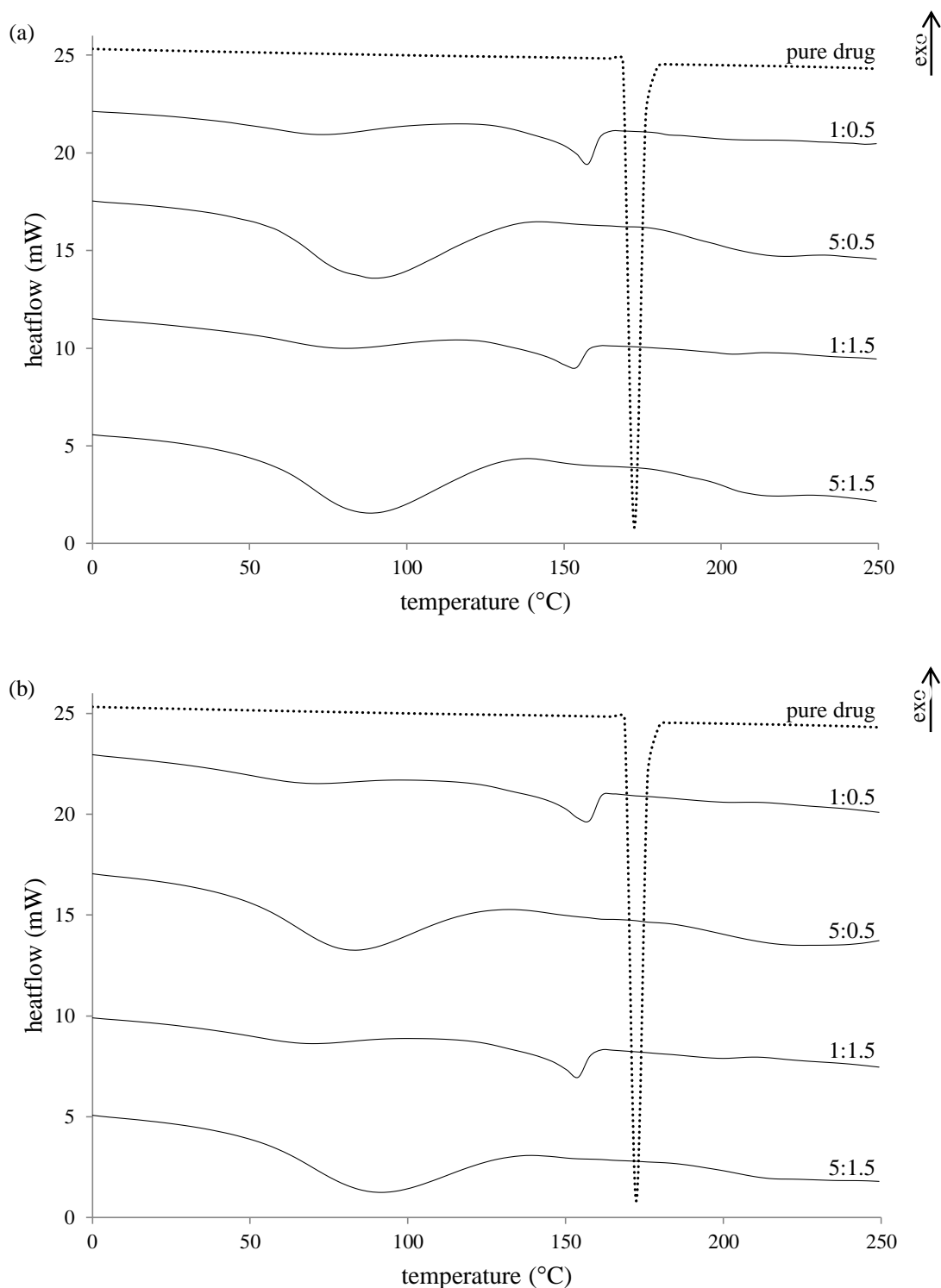
In our previous studies, the processing and formulation parameters were examined by means of experimental design in order to evaluate the effect of each parameter on the release of drug during the early time and therefore the effect on taste-masking efficiency. Further discussions will deal with the comparison between the two types of caseinate used.

The SEM micrographs of spray-dried formulations containing sodium caseinate or calcium caseinate prepared at the same spray-drying conditions (inlet temperature 130°C and spray flow 300 L/h) are shown in Figure III-4. Despite the type of caseinate, the particle morphology differs from each other and depends on the caseinate/lecithin ratio in the dispersion being spray-dried. Due to the high amount of drug, i.e. about 40% and a very short lifetime of the droplet in the spray-dryer (a few milliseconds), the lowest level of caseinate and lecithin is shown not to efficiently encapsulate the acetaminophen so that drug crystals readily expose on the outer surface (Figure III-4a and e). It is known that the encapsulation efficiency can be increased by incorporation of excess surface-active materials, which is the case for higher ratios of caseinate/lecithin [19], [20]. It is worth noting that the formulations containing 5% of caseinate exhibit typically corrugated morphology as a result of protein accumulation at the particle surface [21]. Particularly, the

powders show a tendency to form aggregates since the content of lecithin increases as can be seen in Figures III-4c and g.



**Figure III-4:** SEM micrographs of spray-dried formulations containing (a, b, c, d) sodium caseinate and (e, f, g, h) calcium caseinate which were prepared at the same conditions (inlet temperature 130°C, spray flow 300 L/h) and at different caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried i.e. (a, e) 1:0.5; (b, f) 5:0.5; (c, g) 1:1.5; (d, h) 5:1.5.

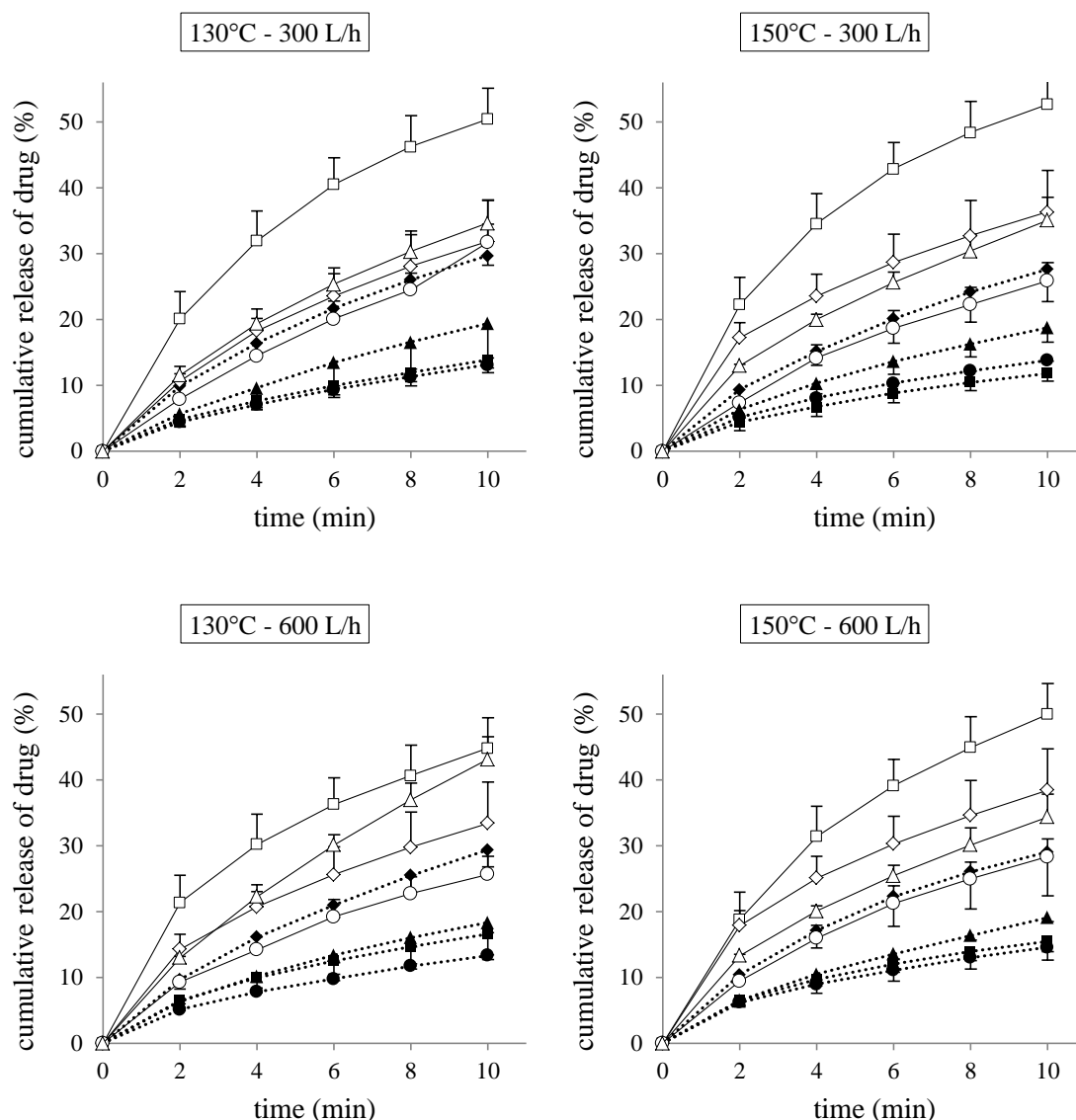


**Figure III-5:** DSC patterns of pure drug and spray-dried formulations containing (a) sodium caseinate and (b) calcium caseinate prepared at the same conditions (inlet temperature 130°C, spray flow 300 L/h) and at different caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried i.e. 1:0.5, 5:0.5, 1:1.5; 5:1.5.

Figure III-5 represents the DSC patterns of the spray-dried formulations prepared at the same conditions (inlet temperature 130°C, spray flow 300 L/h). Clearly, the sodium and calcium caseinate-based powders display similar characteristics, depending on the

caseinate/lecithin ratio. The endotherm peak onset at about 155°C of the 1:0.5 formulations can be attributed to the fusion of drug crystal as observed in the SEM micrographs. A higher level of caseinate amount, i.e. 5%, seems to disperse the drug under molecular state within the matrix since no particular peak is detected. In contrast, the 1:1.5 formulations are shown to encapsulate drug crystal that melts at approximately 155°C. These may reinforce the fact that formulations with higher caseinate amount exhibit higher percentage of release amount whilst the lecithin amount is equal to 1.5%. There is no remarkable difference in the thermal behavior of spray-dried powders containing the same caseinate/lecithin proportions as the spray-drying conditions change (data not shown). This confirms the most important influence of formulation parameters rather than the processing parameters that is revealed by the experimental design.

All spray-dried formulations are demonstrated to delay the drug release, studied by a continuous flow system using syringe pump, in comparison to “uncoated” drug. Interestingly, calcium caseinate-based formulations lower the release profiles to a higher extent compared to sodium caseinate-based formulations (Figure III-6), in particular after the first two minutes (paired samples t-test,  $p < 0.05$ ). Owing to the excellent surface-active properties, proteins and particularly caseins, have a tendency to preferentially accumulate at the air-liquid interface of the droplet during spray-drying. The absorption process involves the structural rearrangement of adsorbed molecules so that the exposition of the hydrophobic regions towards the air phase is expected to be favored [22–24]. Also proteins can self-aggregate into a three-dimensional network through hydrophobic interaction, van der Waals, hydrogen bonding and even covalent interactions, etc. [25], [24], [26]. A protein film forming upon drying is therefore characterized by reduced wettability and swelling capacity that might play a major role in retarding the drug release up to ten minutes. In addition, the presence of calcium is noted to promote the intermolecular cross-linking through divalent bonding that occurs between  $\text{Ca}^{2+}$  and negatively charged carboxyl groups or more specifically with the phosphorylated serine residues of polypeptide chains [27]. That results in reducing the “polymer” segmental mobility and therefore the reactivity of protein film to water upon rehydration, as reported in the literature [28–30]. This may explain the fact that calcium caseinate film delays the drug release to a higher extent than sodium caseinate film.



**Figure III-6:** Drug release profiles of spray-dried formulations containing sodium caseinate (open symbol, full line) and calcium caseinate (closed symbol, dotted line) prepared at difference settings of inlet temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and spray-flow (L/h), and at different caseinate/lecithin ratios (w/w) in the dispersion being spray-dried, i.e. (□, ■) 1:0.5; (◇, ◆) 5:0.5; (●, ○) 1:1.5 and (△, ▲) 5:1.5.

Further release studies are also performed in the HCl pH 1.0 in an attempt to measure the drug dissolution behavior in the stomach. Despite the caseinate type, all formulations are found to release more than 90% of drug after 45 minutes. That is to say that the caseinate “coating” can effectively delay the drug release within the mouth during the early time but do not alter the immediate bioavailability since completely dissolved in the stomach.

Importantly, lecithin is observed to “interact” with two types of caseinate used in terms of significantly affecting the released amount of drug during the first two minutes. Lecithin is mainly composed of phosphatidylcholine, an amphoteric surfactant of low molecular

weight. It is found that protein and low molecular weight surfactant both absorb to the interface by different mechanisms [31]. Therefore, the behavior of a mixture containing these components is of importance in the surface structure and bulk composition of dried droplets. Jayasundera et al. that protein and low molecular surfactant compete to absorb to the surface; surfactant molecules can also bind to protein to form complex through electrostatic and/or hydrophobic interactions [6]. Accordingly, the intrinsic property of each component and the protein/surfactant ratio is known to have a crucial impact. Due to the complexity of the system, further studies should be expected to get better understanding about the lecithin-caseinate “interaction”.

#### **4. Conclusion**

In this study, calcium caseinate in combination with lecithin was investigated for encapsulating the acetaminophen through spray-drying and therefore masking the bitterness of drug. Taste assessment was performed by drug release studies using a continuous flow system. The  $2^4$ -full factorial design demonstrated that the spray flow, the calcium caseinate amount and the lecithin amount had the most important effects on the drug release during the first two minutes. The “interaction” between calcium caseinate amount and lecithin amount was also revealed to be statistically significant as observed for sodium caseinate, which suggests further experiments in order to thoroughly understand this interaction. The characteristics of spray-dried formulations determined by SEM and DSC are shown to depend on the proportion of caseinate/lecithin rather than the type of caseinate, i.e. sodium and calcium caseinate. Interestingly, calcium caseinate-based formulations are found to lower the released amount of drug during the early time to a higher extent than sodium caseinate-based formulations, which indicates a better taste masking efficiency.

#### ***Acknowledgements***

The authors would like to thank Dr. Ahmed Addad (Unité Matériaux et Transformations, CNRS UMR 8207, Université Lille 1) for his assistance in SEM analysis.

## References

- [1] T. Janjarasskul and J. M. Krochta, “Edible packaging materials,” *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 1, no. 1, pp. 415–448, 2010.
- [2] Y. D. Livney, “Milk proteins as vehicles for bioactives,” *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 15, no. 1–2, pp. 73–83, 2010.
- [3] A. O. Elzoghby, W. S. Abo El-Fotoh, and N. A. Elgindy, “Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems,” *J Control Release*, vol. 153, no. 3, pp. 206–216, 2011.
- [4] A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, “Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems,” *J Control Release*, vol. 161, no. 1, pp. 38–49, 2012.
- [5] J. Bonilla, L. Atarés, M. Vargas, and A. Chiralt, “Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality - Possibilities and limitations,” *J Food Eng*, vol. 110, no. 2, pp. 208–213, 2012.
- [6] M. Jayasundera, B. Adhikari, P. Aldred, and A. Ghandi, “Surface modification of spray dried food and emulsion powders with surface-active proteins - A review,” *J Food Eng*, vol. 93, no. 3, pp. 266–277, 2009.
- [7] M. S. Latha, A. V. Lal, T. V. Kumary, R. Sreekumar, and A. Jayakrishnan, “Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres - In vitro studies and in vivo response in rabbits,” *Contraception*, vol. 61, no. 5, pp. 329–334, 2000.
- [8] E. Bulgarelli, F. Forni, and M. T. Bernabei, “Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties,” *Int J Pharm*, vol. 198, no. 2, pp. 157–165, 2000.
- [9] O. Abu Diak, A. Bani-Jaber, B. Amro, D. Jones, and G. P. Andrews, “The manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 85, no. 3, pp. 284–290, 2007.
- [10] F. Song, L. M. Zhang, C. Yang, and L. Yan, “Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery,” *Int J Pharm*, vol. 373, no. 1–2, pp. 41–47, 2009.
- [11] F. Song, L. M. Zhang, J. F. Shi, and N. N. Li, “Novel casein hydrogels - Formation, structure and controlled drug release,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 79, no. 1, pp. 142–148, 2010.
- [12] P. Mendes de Souza, A. Fernández, G. López-Carballo, R. Gavara, and P. Hernández-Muñoz, “Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme,” *Food Hydrocoll*, vol. 24, no. 4, pp. 300–306, 2010.
- [13] L. K. Creamer and A. K. H. MacGibbon, “Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids,” *Int. Dairy J.*, vol. 6, no. 6, pp. 539–568, 1996.
- [14] G. O. Phillips and P. A. Williams, *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, 2000.
- [15] N. Martin, “Évaluation et modification des propriétés du phosphocaséinate de calcium obtenu par microfiltration du lait de vache,” Université Laval, Québec, Canada, 1999.

- [16] T. H. Hoang Thi, S. Morel, F. Ayouni, and M. P. Flament, “Development and evaluation of taste-masked drug for paediatric medicines – Application to acetaminophen,” *Int J Pharm*, vol. 434, no. 1–2, pp. 235–242, 2012.
- [17] A. Preetha and B. Banerjee, “Comparison of artificial saliva substitutes,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 18, no. 2, pp. 178–186, 2005.
- [18] J. Antony, *Design of experiments for engineers and scientists*. Oxford, England: Butterworth-Heinemann, 2003.
- [19] J. Elversson and A. Millqvist-Fureby, “In situ coating - An approach for particle modification and encapsulation of proteins during spray-drying,” *Int J Pharm*, vol. 323, no. 1–2, pp. 52–63, 2006.
- [20] S. Drusch, Y. Serfert, A. Berger, M. Q. Shaikh, K. Rätzke, V. Zaporojtchenko, and K. Schwarz, “New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein,” *Food Hydrocoll*, vol. 27, no. 2, pp. 332–338, 2012.
- [21] R. Vehring, W. R. Foss, and D. Lechuga-Ballesteros, “Particle formation in spray-drying,” *J Aerosol Sci*, vol. 38, no. 7, pp. 728–746, 2007.
- [22] D. E. Graham and M. C. Phillips, “Proteins at liquid interfaces - I. Kinetics of adsorption and surface denaturation,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 70, no. 3, pp. 403–414, 1979.
- [23] K. Landström, T. Arnebrant, J. Alsins, and B. Bergenståhl, “Competitive protein adsorption between  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin during spray-drying - Effect of calcium induced association,” *Food Hydrocoll*, vol. 17, no. 1, pp. 103–116, 2003.
- [24] C. R. Vessely, J. F. Carpenter, and D. K. Schwartz, “Calcium-induced changes to the molecular conformation and aggregate structure of  $\beta$ -Casein at the air–water interface,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 6, pp. 3334–3344, 2005.
- [25] G. R. Ziegler and E. A. Foegeding, “The gelation of proteins,” in *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. Volume 34, California, USA: Academic Press, 1990, pp. 203–298.
- [26] L. Chen, G. E. Remondetto, and M. Subirade, “Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 17, no. 5, pp. 272–283, 2006.
- [27] C. Holt, “Structure and stability of bovine casein micelles,” in *Advances in Protein Chemistry*, vol. Volume 43, California, USA: Academic Press, 1992, pp. 63–151.
- [28] R. J. Avena-Bustillos and J. M. Krochta, “Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content,” *J. Food Sci.*, vol. 58, no. 4, pp. 904–907, 1993.
- [29] M. J. Fabra, P. Talens, and A. Chiralt, “Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films,” *J Food Eng*, vol. 96, no. 3, pp. 356–364, 2010.
- [30] F. M. Monedero, M. J. Fabra, P. Talens, and A. Chiralt, “Effect of calcium and sodium caseinates on physical characteristics of soy protein isolate-lipid films,” *J Food Eng*, vol. 97, no. 2, pp. 228–234, 2010.
- [31] C. C. Sánchez, M. R. Rodríguez Niño, A. L. Caro, and J. M. Rodríguez Patino, “Biopolymers and emulsifiers at the air-water interface - Implications in food colloid formulations,” *J Food Eng*, vol. 67, no. 1–2, pp. 225–234, 2005.



## **CHAPITRE IV**

**Essai d'analyse de la « couche d'encapsulant » par la spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS)**

## 1. Introduction

Dans de nombreux cas, les propriétés de surface en termes de topographie et de composition sont cruciales car elles influencent le comportement du produit notamment ses propriétés fonctionnelles. Par exemple, dans le cadre de cette étude, la caractérisation de la surface des particules nous permettra de déterminer la composition chimique de celle-ci et de la mettre en relation avec sa performance, c'est-à-dire, retarder la libération du principe actif durant un court laps de temps dans le but du masquage de goût.

Il existe diverses techniques d'analyse de surface qui ont été récemment recensées par [1]. Parmi celles-ci, la technique ToF-SIMS représente une méthode plus avantageuse grâce à une meilleure sensibilité de détection de l'extrême surface, une excellente résolution spatiale et spectrale. En particulier, cette technique est capable d'explorer les ions moléculaires plutôt que l'analyse élémentaire, ce qui la rend plus spécifique pour caractériser les composants organiques [2–5].

Dans ce chapitre, nous allons aborder l'application de la méthode ToF-SIMS en vue d'analyser la « couche d'encapsulant » des particules de principe actif de deux formulations prototypes en complément de l'étude auparavant présentée dans le Chapitre I.

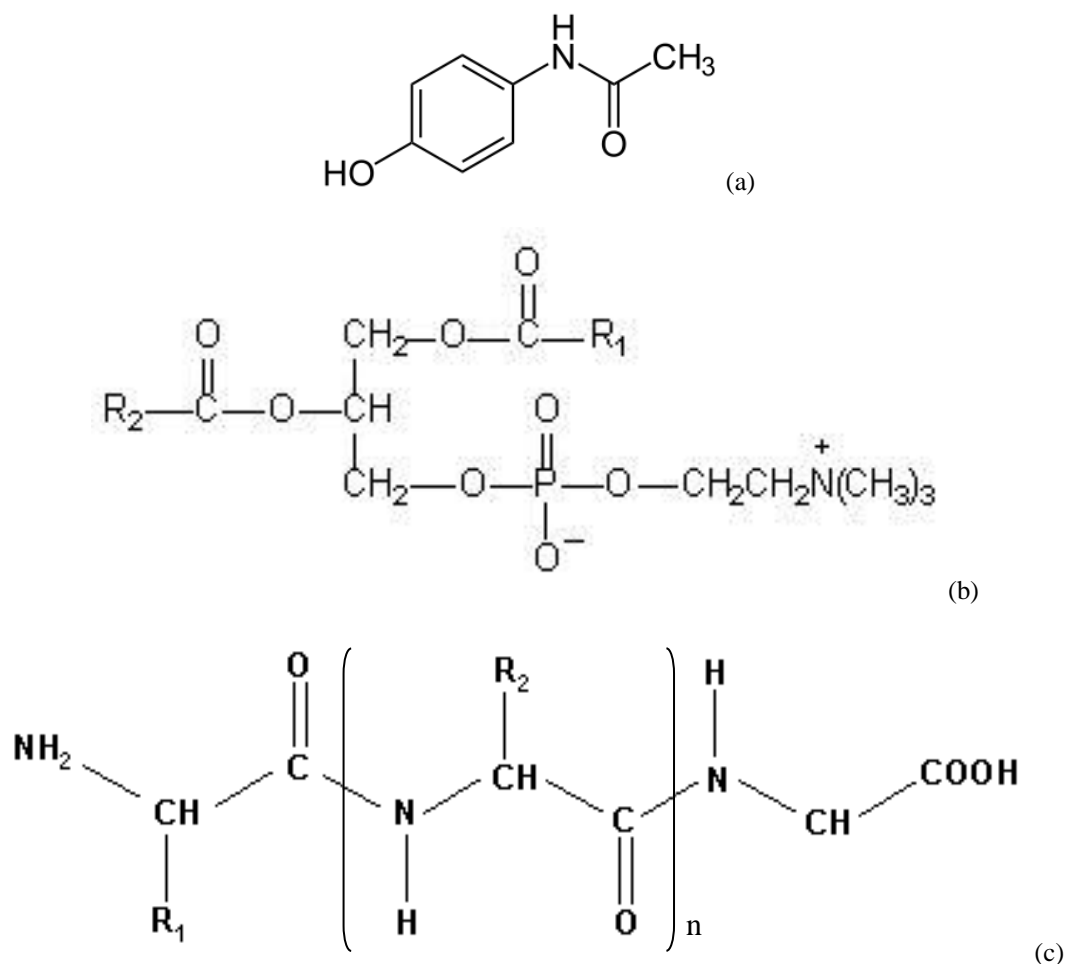
## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Echantillons

Les poudres de substance pure ont été analysées par ToF-SIMS afin d'acquérir des spectres de référence de l'acétaminophène (Cooper, Melun, France), de la lécithine de soja raffinée (Alfa Aesar, Massachusetts, Etats-Unis) et du caséinate de sodium (Sigma Aldrich, Missouri, Etats-Unis) (Figure IV-1). Deux formulations prototypes dont la méthode de préparation est décrite dans le Chapitre I ont été analysées et leur composition est détaillée dans le Tableau IV-1.

**Tableau IV-1: Composition des formulations prototypes.**

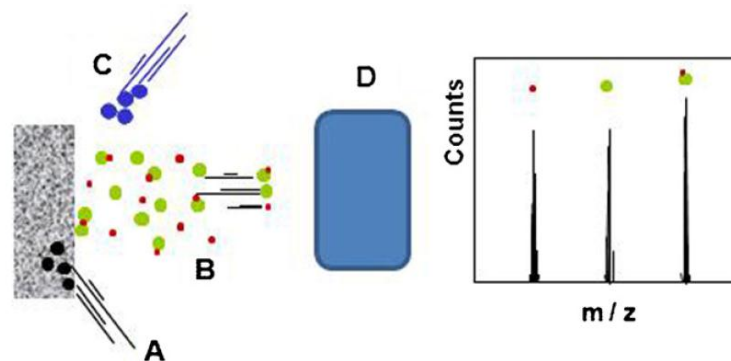
Formulation	% en matière solide (m/m)		
	Acétaminophène	Caséinate de sodium	Lécithine
1:0,5	40,0	40,0	20,0
5:1,5	13,3	66,7	20,0



**Figure IV-1:** Représentation de la structure moléculaire (a) de l'acétaminophène, (b) du caséinate de sodium et (c) de la lécithine.

## 2.2. Principe de la technique ToF-SIMS [6]

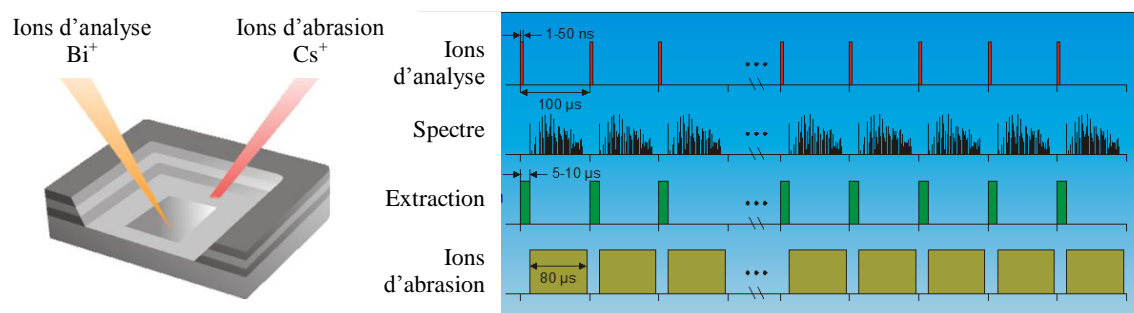
La spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) est basée sur la détection des ions secondaires produits sous l'effet du bombardement de l'échantillon par un faisceau d'ions primaires incidents. L'impact d'un ion ou d'une molécule possédant une énergie de quelques keV engendre l'émission de rayonnement et de particules de différentes natures comme des photons, des électrons secondaires, des particules neutres (atomes ou molécules), des ions secondaires positifs et négatifs caractéristiques de l'échantillon. Seuls les ions secondaires sont extraits et analysés par l'analyseur de masse à temps de vol. Le principe de celui-ci est de mesurer le temps de parcours des ions secondaires dans l'analyseur, ce qui est proportionnel à la racine carrée de la masse de ces derniers. Le spectre de masse obtenu représente l'intensité des ions secondaires émis en fonction de leur masse (Figure IV-2).



**Figure IV-2:** Schéma du principe de ToF-SIMS. L'impact des ions primaires (A) produit l'émission des ions secondaires (B) qui font l'objet de l'analyse par l'analyseur de masse à temps de vol (D). Le tir d'électrons (C) a pour but de neutraliser la charge accumulée sur l'échantillon (selon [5]).

Il y a deux modes d'analyse ToF-SIMS:

- Le SIMS « statique » met en œuvre une dose totale d'ions primaires inférieure à  $10^{12}$  ions par  $\text{cm}^2$ , ce qui permet d'analyser l'extrême surface (de l'ordre de quelques angströms) lorsque seulement la première couche moléculaire ou atomique est pulvérisée au cours d'une analyse.
- Le SIMS « dynamique » utilise un deuxième faisceau d'ions d'intensités plus importantes afin d'abraser progressivement la surface de l'échantillon. Au cours d'une analyse, l'évolution du signal est suivie en fonction de la pénétration dans l'échantillon. Il en résulte le profil en profondeur avec une résolution de l'ordre de quelques nanomètres (Figure IV-3).



**Figure IV-3:** Principe du SIMS « dynamique » pour l'acquisition d'un profil en profondeur montrant l'alternance entre la courte impulsion des ions d'analyse, l'extraction des ions secondaires et l'impulsion plus longue des ions d'abrasion.

### 2.3. Conditions expérimentales

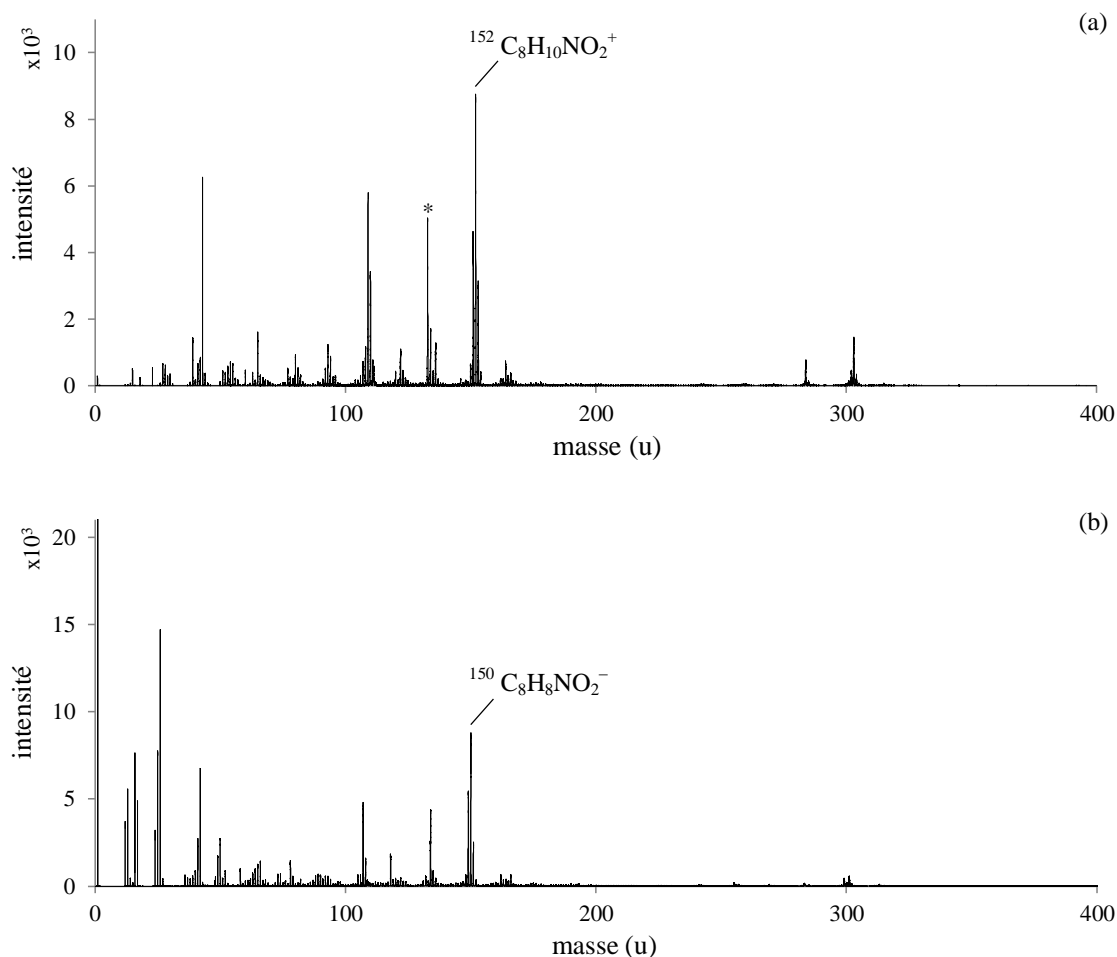
L'échantillon en poudre est dégazé sous un vide inférieur à  $10^{-8}$  Torr avant l'analyse. Les expériences sont réalisées sur un système de ToF-SIMS V (IONTOF GmbH, Allemagne) équipé d'un canon à ions Bismuth  $\text{Bi}^+$ . Une source pulsée d'ions primaires de  $\text{Bi}^{3+}$  (25 keV

d'énergie et 0,25 pA d'intensité) est utilisée pour analyser l'extrême surface des particules de poudre. Les spectres de masse en polarité positive et négative sont acquis par pulvérisation d'une zone de 500 x 500 µm pendant 100 secondes. La compensation de la charge est effectuée à l'aide des électrons pulsés de basse énergie (20 eV). Pour réaliser le profil en profondeur, nous utilisons un deuxième faisceau d'ions Césium Cs<sup>+</sup> (0,5kV d'énergie et 25 nA d'intensité) comme ions d'abrasion. Le faisceau de Bi<sup>3+</sup> reste le faisceau d'analyse. La zone analysée est toujours plus petite que la zone creusée généralement d'un facteur de trois afin d'éviter les effets liés au bord du cratère.

### 3. Résultats et discussion

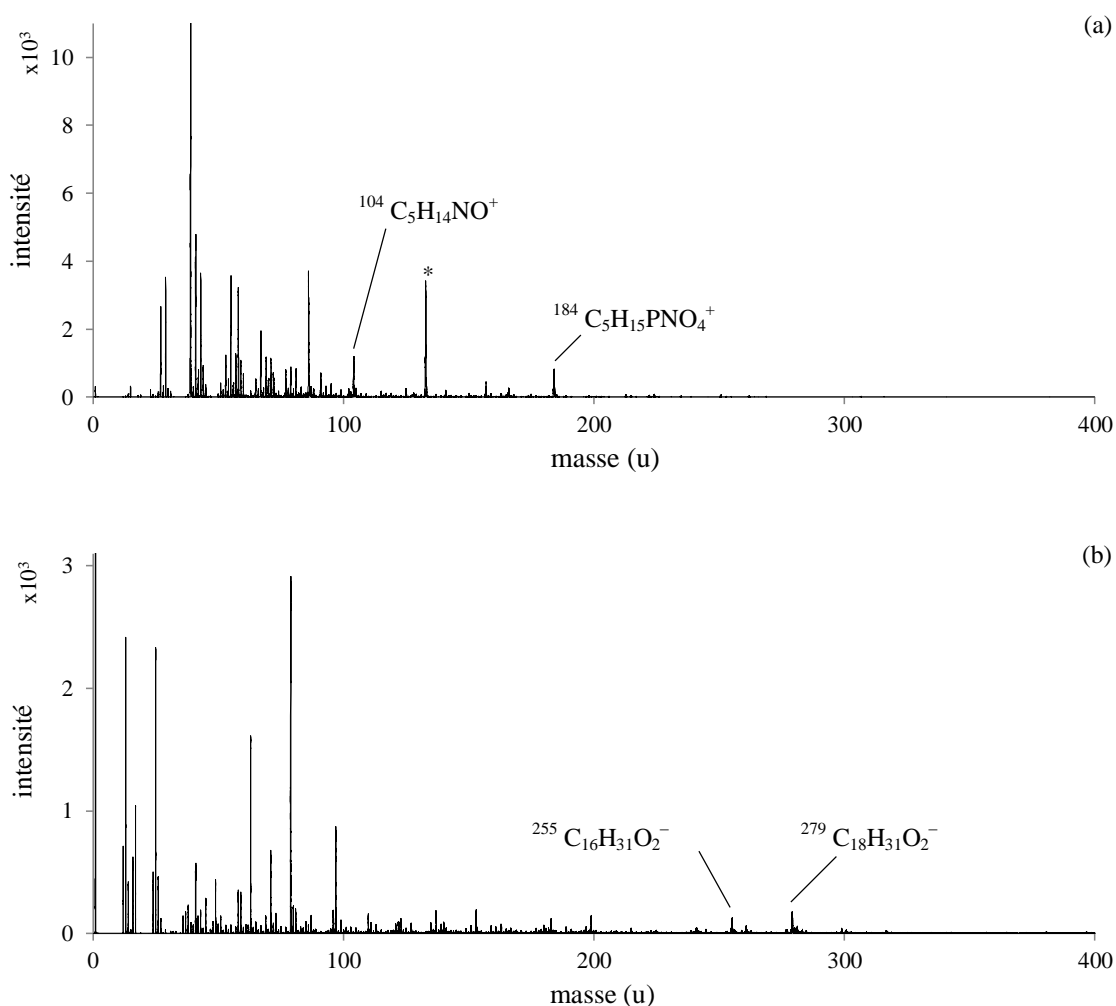
#### 3.1. Les spectres de masse de référence

Les spectres de masse ont été effectués sur les substances pures afin d'identifier leurs ions caractéristiques. Ces spectres représentent l'intensité des ions secondaires émis en fonction du ratio m/z. Les polarités positives et négatives ont été étudiées et sont présentés sur les Figures IV-4, IV-5 et IV-6.



**Figure IV-4:** Spectrométrie de masse de l'acétaminophène en polarité (a) positive et (b) négative.

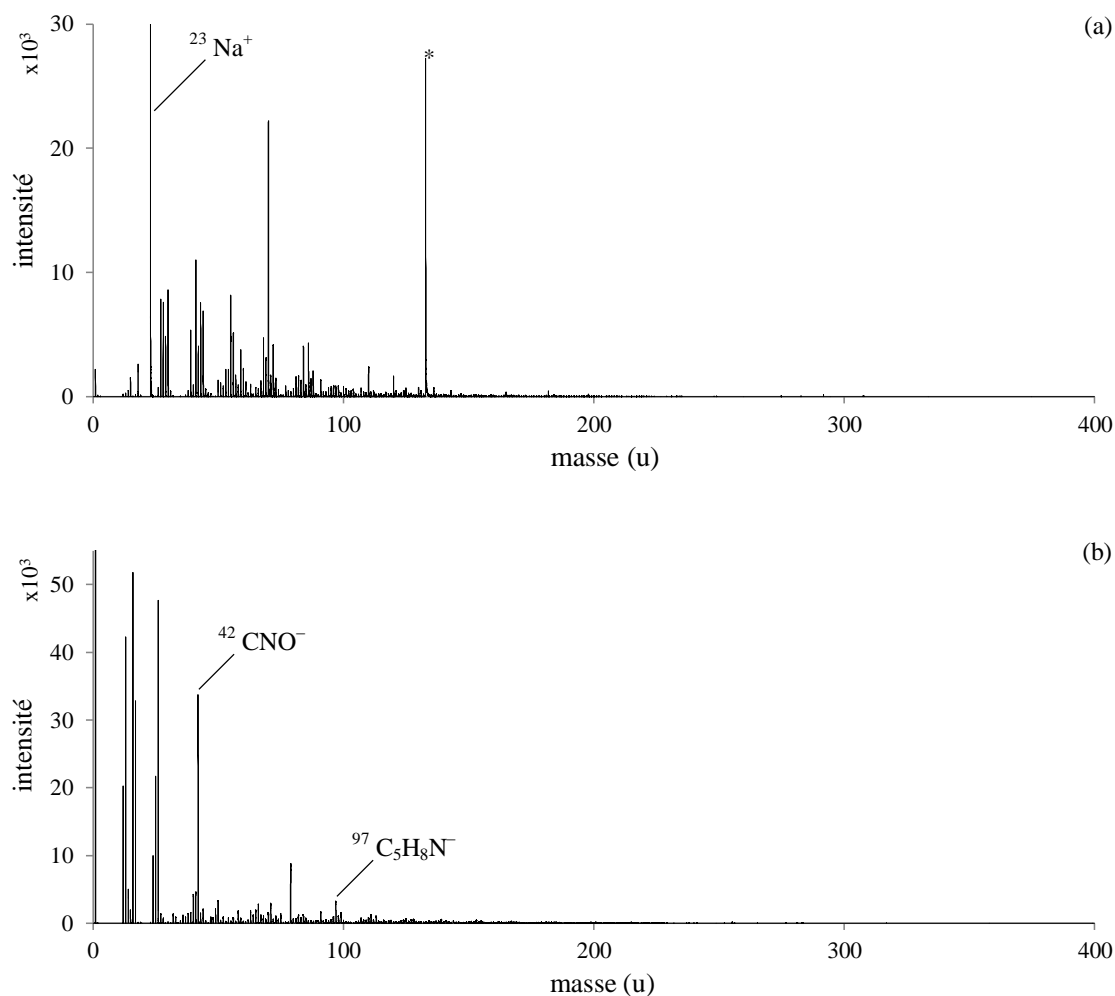
L'acétaminophène ( $C_8H_9NO_2$ , masse moléculaire de 151) sous l'impact des ions primaires forme des fragments atomiques et moléculaires ionisés dont la masse varie entre 0 à 400 uma. Nous détectons dans les spectres de masse des pics qui peuvent spécifiquement caractériser le principe actif, à savoir le pic de  $^{152}C_8H_{10}NO_2^+$  correspondant à une molécule intacte chargée d'un hydrogène  $[M+H]^+$  dans le spectre positif, ainsi que le pic de  $^{150}C_8H_8NO_2^-$  d'une molécule qui perd un hydrogène  $[M-H]^-$  dans le spectre négatif, comme indiqué dans la Figure IV-4 [2].



**Figure IV-5:** Spectrométrie de masse de la lécithine en polarité (a) positive et (b) négative.

La Pharmacopée Européenne décrit la lécithine comme un mélange complexe de phosphatides insolubles dans l'acétone, dont la composition varie énormément en fonction de la source de la lécithine et le degré de purification. La lécithine de soja raffinée utilisée dans cette étude contient principalement de la phosphatidylcholine (98%) qui se compose d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux chaînes d'acides gras. Par

conséquent, le spectre de masse en polarité positive révèle un pic de  $^{104}\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$  correspondant au fragment de choline et un pic de  $^{184}\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$  caractérisant le fragment de choline combinée avec le phosphate. En outre, les fragments des acides gras sont identifiables par les pics de masse élevée dans le spectre en polarité négative, à savoir le pic de  $^{255}\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2^-$  représentant l'acide palmitique [M-H] et le pic de  $^{279}\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2^-$  représentant l'acide linoléique [M-H] (Figure IV-5).



**Figure IV-6:** Spectrométrie de masse du caséinate de sodium en polarité (a) positive et (b) négative.

La caséine est une protéine issue du lait et qui par conséquent est riche en variété d'acides aminés. Typiquement, cette protéine se différencie d'autres molécules par la présence d'un grand nombre de proline [7–9]. C'est la raison pour laquelle, le fragment de ce résidu correspondant au pic de  $^{97}\text{C}_5\text{H}_8\text{N}^-$  ([M-H<sub>2</sub>O] dû à la formation de la liaison peptidique) en polarité négative peut être un indicateur de la caséine. Le pic de  $^{42}\text{CNO}^-$  de haute intensité est également caractéristique de cette dernière et représente le groupement d'amide de la chaîne polypeptidique. D'autre part, le spectre en polarité positive montre clairement une

forte présence de cation sodium  $^{23}\text{Na}^+$  détectable à partir du caséinate de sodium comme indiqué dans la Figure IV-6.

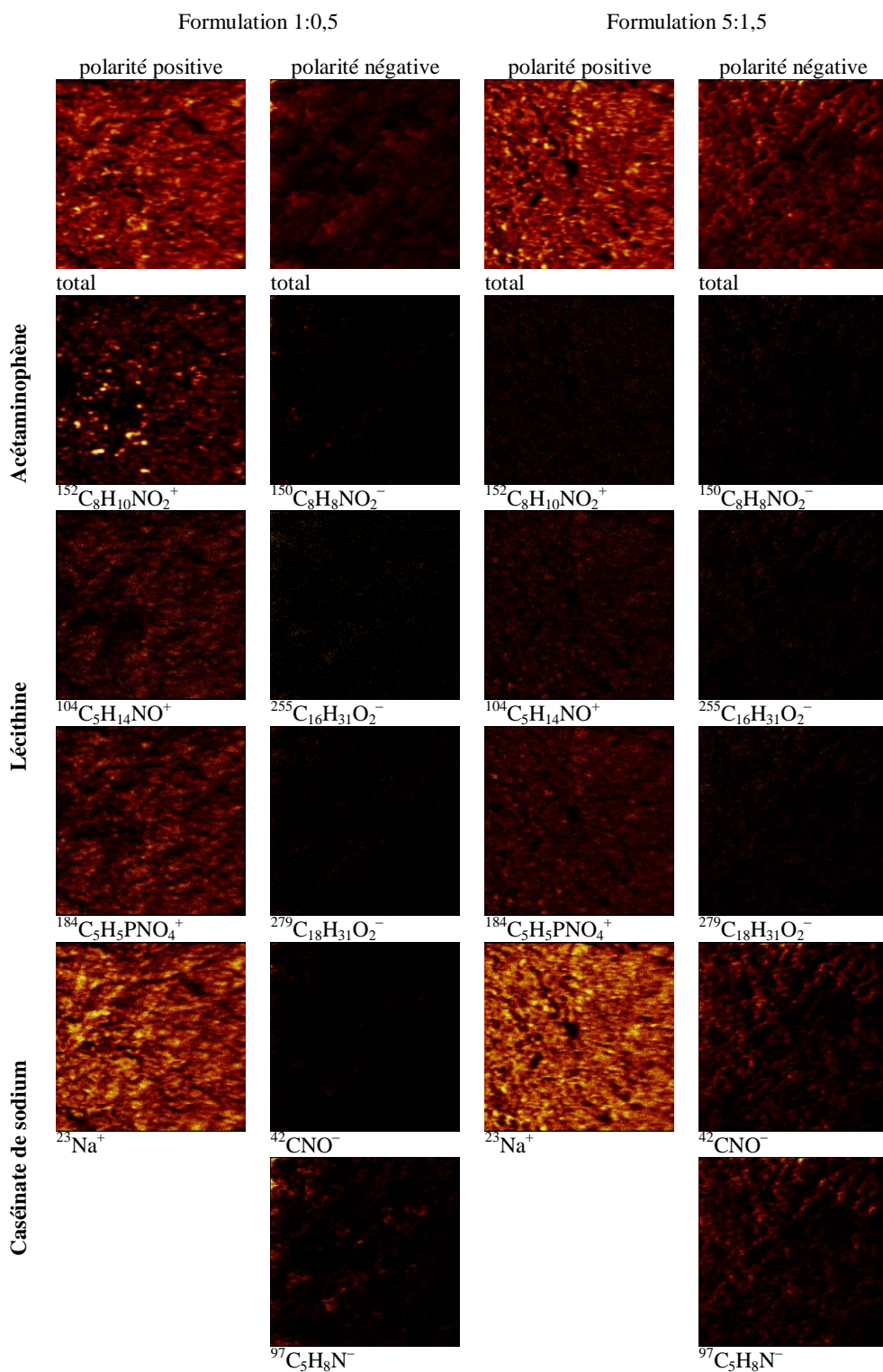
Il faut noter qu'un pic à 133 apparaît dans les spectres en polarité positive est probablement dû à la contamination de césium dans la chambre d'analyse (ce pic est marqué par un astérisque sur les figures).

### ***3.2. La composition de l'extrême surface des particules de formulations prototypes***

Par la suite, les deux formulations prototypes ont été analysées en mode statique pour examiner la composition chimique de l'extrême surface des particules (profondeur d'analyse environ 1 nm). En effet, la surface joue un rôle crucial dans le comportement du produit lors du contact avec le milieu de libération, et donc détermine la sensation ou non du goût du principe actif ainsi que la libération du principe actif.

L'imagerie par ToF-SIMS est basée sur la collection des spectres acquis à chaque pixel lors du balayage des ions primaires sur l'échantillon. La Figure IV-7 montre les images ioniques de deux formulations prototypes (1:0,5 et 5:1,5) lors de l'analyse sur une zone de 500 x 500  $\mu\text{m}$ . L'image dite « total » reflète l'ensemble des ions secondaires émis, à partir desquels l'espèce ionique caractéristique du composant de l'intérêt identifié par les spectres de référence peut être extraite. Il faut rappeler que la possibilité de quantification par ToF-SIMS est néanmoins relative. En effet, l'intensité du signal d'une espèce spécifique dépend de plusieurs facteurs, dont sa concentration à la surface, le flux d'ions primaires et notamment la probabilité de transformation, c'est-à-dire, le rendement de pulvérisation ainsi que la probabilité d'ionisation. La probabilité de transformation variant de plusieurs ordres de grandeur en fonction de la structure moléculaire, de la matrice où se trouve l'espèce dite n'est pas déterminée pour la plupart des substances chimiques [2], [6]. C'est la raison pour laquelle, les images ioniques sont qualitatives, autrement dit, elles permettent notamment d'identifier les espèces présentes.





**Figure IV-7:** Images ioniques par ToF-SIMS de formulations prototypes sur une zone de 500 x 500  $\mu\text{m}$ .

Nous constatons que les spectres de masse en polarité négative des deux formulations sont constitués principalement de fragments ionisés de faible masse (Annexe IV-1). Ceci explique l'absence de signal des espèces électronégatives caractéristiques des composants

qui possèdent de masse plus élevée dans les images ioniques (Figure IV-7). Par contre, les images des ions positifs sont riches en information sur la composition de surface des particules. Comme nous pouvons le constater, dans le cas de la formulation 1:0,5, les signaux des espèces spécifiques sont tous détectables. Cela confirme la présence des composants correspondants, à savoir l'acétaminophène, la lécithine et le caséinate de sodium, à l'extrême surface des particules. En particulier, les signaux de l'acétaminophène dans les images à haute résolution nous permettent de présumer de la distribution de ce dernier sur la surface analysée (Annexe IV-2). Cela veut dire que le principe actif forme de « grands » cristaux à la surface comme nous pouvons également l'observer sur les images de la microscopie électronique à balayage (voir Chapitre I). Concernant la formulation 5:1,5, l'image « total » est majoritairement établie par les contributions du signal de caséinate de sodium, dont  $^{23}\text{Na}^+$  en polarité positive ou bien  $^{42}\text{CNO}^-$  et  $^{97}\text{C}_5\text{H}_8\text{N}^-$  en polarité négative. Le manque de signal d'acétaminophène dans la Figure IV-4 ainsi que dans les images à haute résolution (Annexe IV-3) permet de confirmer l'absence de ce composant à l'extrême surface, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans l'étude précédente (voir chapitre I). Quant à la lécithine, il est difficile de conclure à sa contribution à l'extrême surface. Cependant, étant donné l'intensité du signal relativement faible (Figure IV-7) ou quasiment nulle (Annexe IV-3) sur les images ioniques et les résultats de XPS, nous pouvons admettre que la concentration de la lécithine à l'extrême surface dans le cas de la formulation 5:1,5 est minime comparativement à la formulation 1:0,5.

En bref, vue la composition en matière solide des formulations prototypes (Tableau IV-1), l'extrême surface des particules reflète bien la composition vrac dans le cas de la formulation 1:0,5 alors que l'augmentation du caséinate de sodium aux dépens de l'acétaminophène rend l'extrême surface abondante en caséinate dans le cas de la formulation 5:1,5. Ceci nous permet d'assumer l'hypothèse du mécanisme d'encapsulation de principe actif par atomisation-séchage, comme nous en avons discuté dans les chapitres précédents. Ainsi, ces résultats confirment ceux énoncés dans le Chapitre I, et permettent de mettre en relation la composition de la surface et la performance des formulations prototypes exprimée par le retard de libération du principe actif durant un court laps de temps (quelques minutes) dans le but du masquage de goût.

### **3.3 Le profil en profondeur**

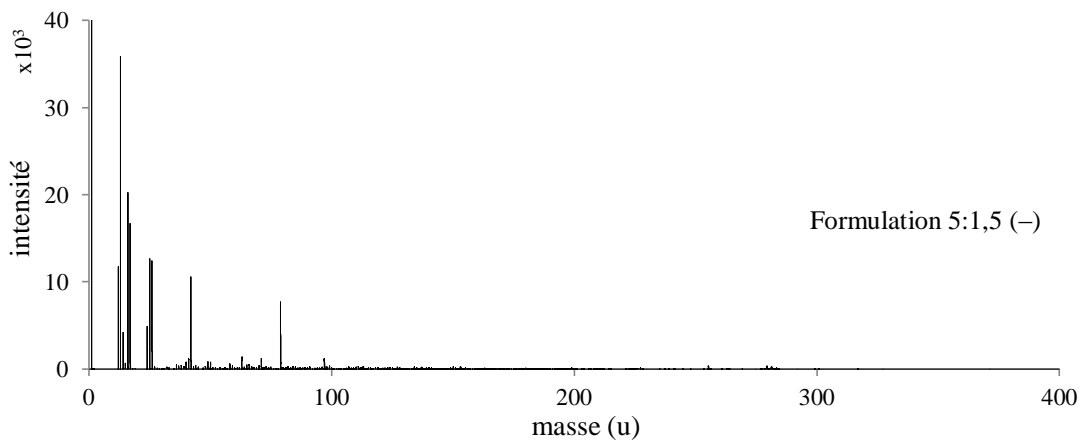
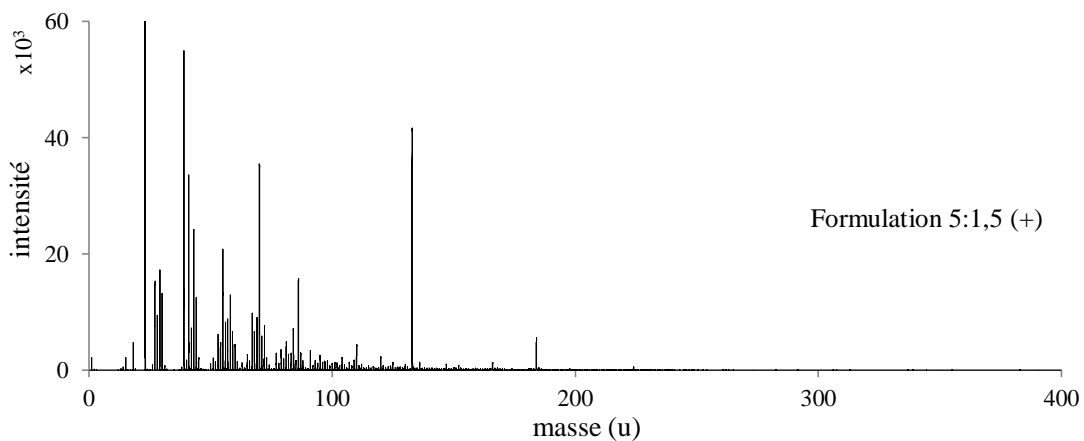
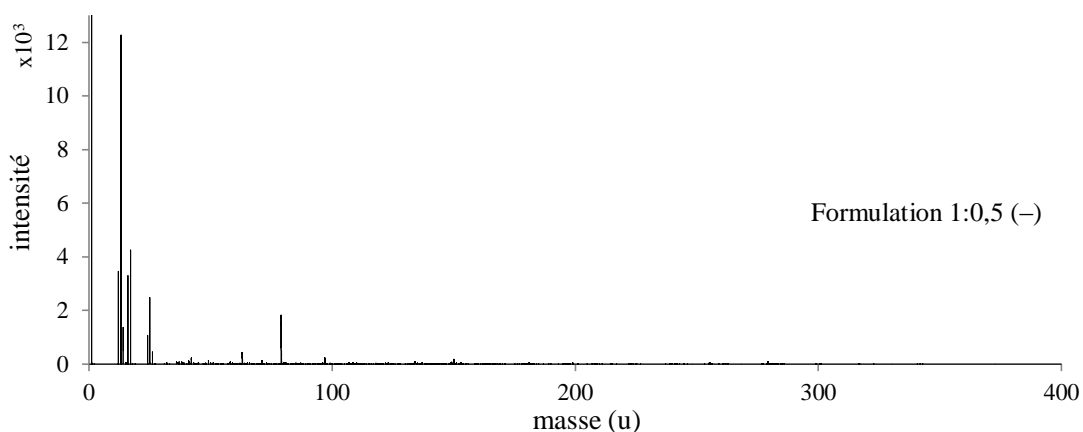
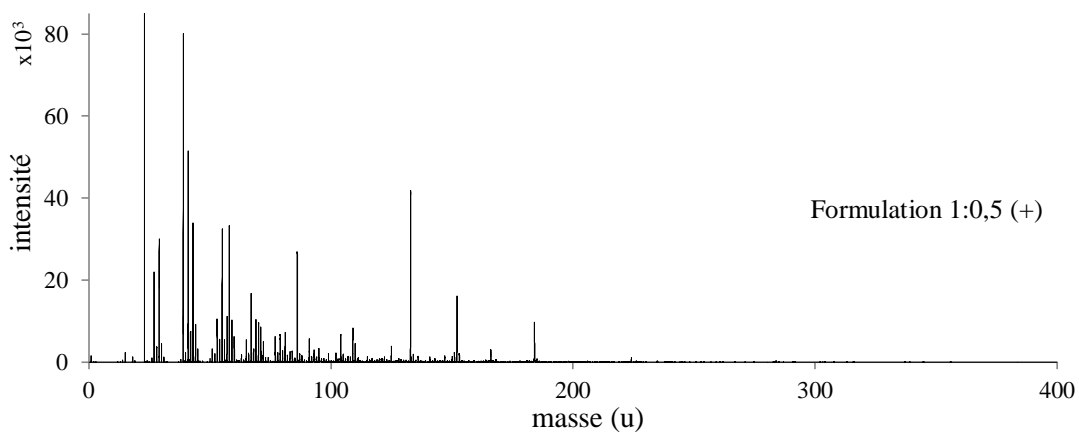
Ces analyses ont été menées en second temps dans le but d'explorer la distribution et/ou la composition des différents composants dans l'épaisseur de la « couche d'encapsulant » qui pourrait influencer la libération du principe actif au cours du temps. C'est aussi dans le but de mieux comprendre la façon dont interagissent la lécithine et le caséinate de sodium sur la quantité du principe actif libéré durant les deux premières minutes de la libération comme nous pouvons le constater dans le Chapitre II. Néanmoins, les premiers essais ne donnent pas de résultat interprétable en raison d'une fragmentation excessive des ions secondaires par les ions primaires. Des travaux supplémentaires sont donc indispensables afin de déterminer les conditions expérimentales les plus adaptés.

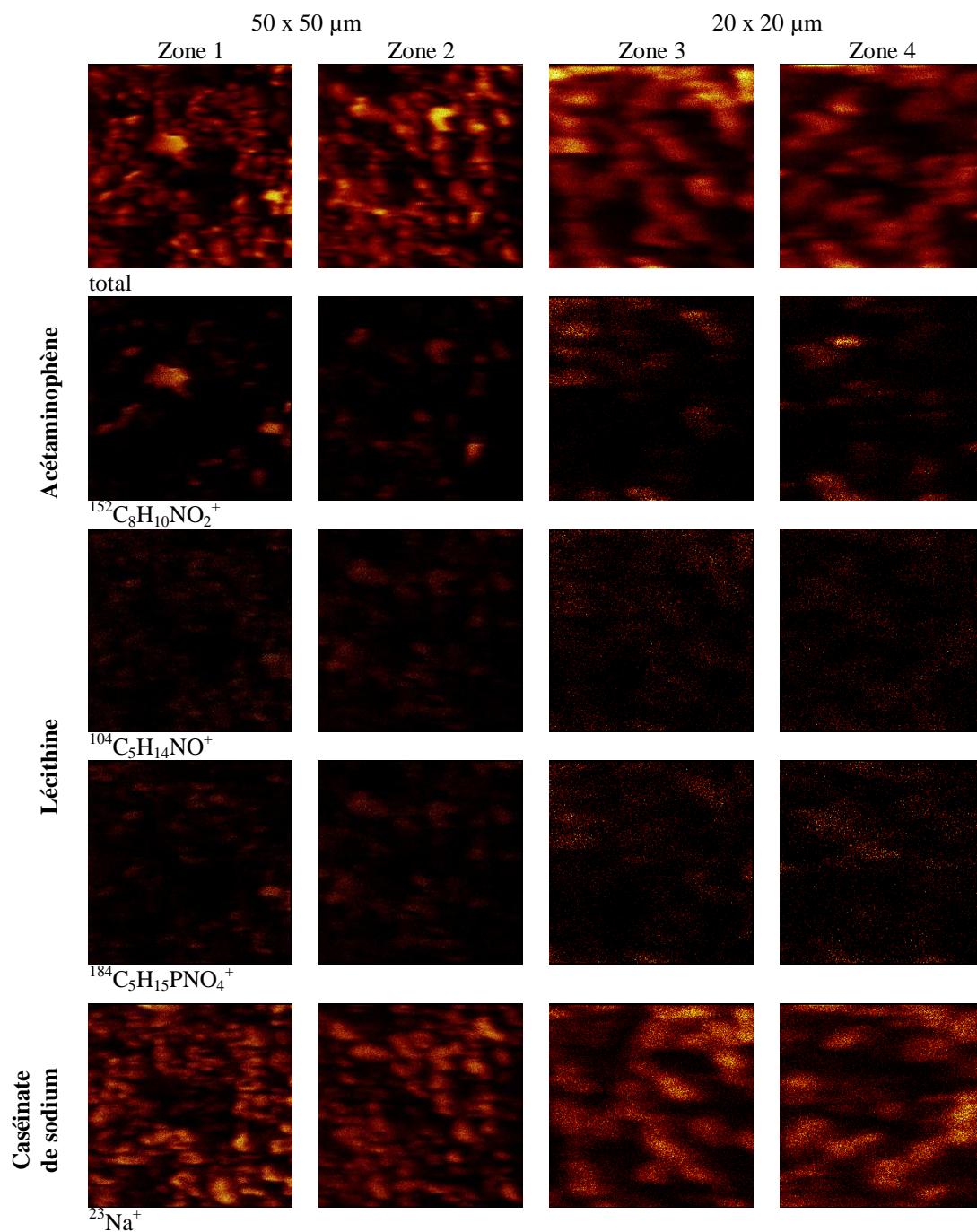
## **4. Conclusion**

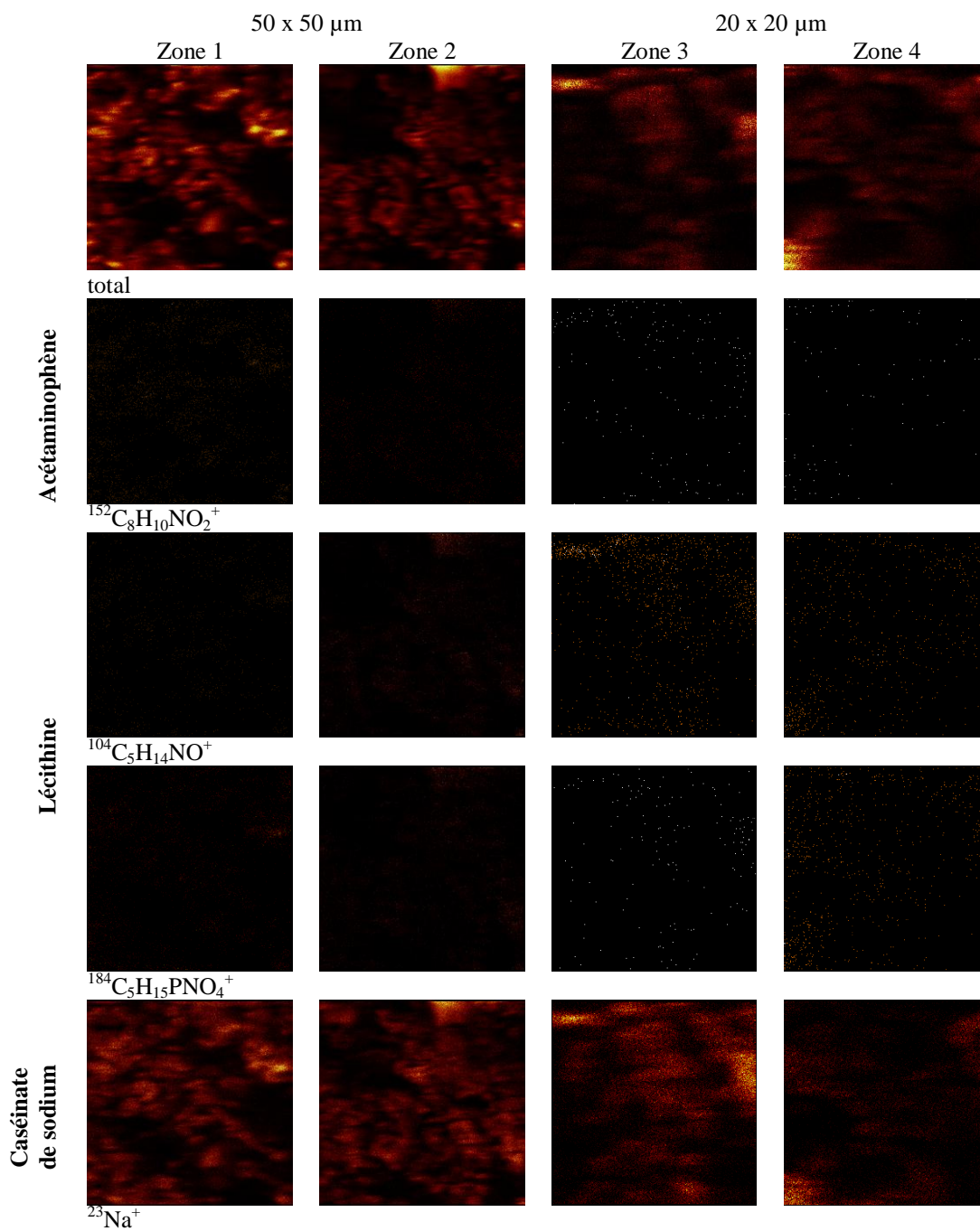
Cette étude a pour but d'analyser la composition chimique de l'extrême surface des particules de deux formulations prototypes (1:0,5 et 5:1,5) par la technique ToF-SIMS. Les résultats obtenus sont en bonne corrélation avec ceux obtenus par la microscopie électronique à balayage et XPS. De plus, cette technique pourrait être prometteuse pour sonder le profil de la composition en profondeur afin de mieux comprendre la performance du produit à condition que les paramètres expérimentaux appropriés soient déterminés. Notamment, l'utilisation de nouvelle source polyatomique telle l'Argon 2500 (Ar<sub>2500</sub>) semble prometteuse pour le profilage de composés organiques sans fragmentation excessive des molécules. Enfin, une attention particulière devrait être apportée quant à la préparation des échantillons afin de répondre aux exigences du ToF-SIMS en termes de rugosité de surface et qui devrait idéalement être compatible avec la résolution latérale qui est d'environ 1 µm dans les conditions standard d'analyse.

**Références**

- [1] I. Murrieta-Pazos, C. Gaiani, L. Galet, R. Calvet, B. Cuq, and J. Scher, “Food powders - Surface and form characterization revisited,” *J Food Eng*, vol. 112, no. 1–2, pp. 1–21, 2012.
- [2] A. M. Belu, M. C. Davies, J. M. Newton, and N. Patel, “ToF-SIMS characterization and imaging of controlled-release drug delivery systems,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 22, pp. 5625–5638, 2000.
- [3] A. Belu, C. Mahoney, and K. Wormuth, “Chemical imaging of drug eluting coatings - Combining surface analysis and confocal Raman microscopy,” *J Control Release*, vol. 126, no. 2, pp. 111–121, 2008.
- [4] G. L. Fisher, A. M. Belu, C. M. Mahoney, K. Wormuth, and N. Sanada, “Three-dimensional time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of a pharmaceutical in a coronary stent coating as a function of elution time,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 24, pp. 9930–9940, 2009.
- [5] T. J. Barnes, I. M. Kempson, and C. A. Prestidge, “Surface analysis for compositional, chemical and structural imaging in pharmaceuticals with mass spectrometry - A ToF-SIMS perspective,” *Int J Pharm*, vol. 417, no. 1–2, pp. 61–69, 2011.
- [6] J. C. Vickerman and I. Gilmore, *Surface analysis - The principal techniques*, First ed. New Jersey, USA: John Wiley and Sons, 2009.
- [7] L. K. Creamer and A. K. H. MacGibbon, “Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids,” *Int. Dairy J.*, vol. 6, no. 6, pp. 539–568, 1996.
- [8] N. Martin, “Évaluation et modification des propriétés du phosphocaséinate de calcium obtenu par microfiltration du lait de vache,” Université Laval, Québec, Canada, 1999.
- [9] G. O. Phillips and P. A. Williams, *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, 2000.

**Annexe IV-1: Spectrométrie de masse par ToF-SIMS des formulations prototypes.**

**Annexe IV-2: Images ioniques (+) à haute résolution de la formulation 1:0,5.**

**Annexe IV-3: Images ioniques (+) en haute résolution de la formulation 5:1,5.**

## **CHAPITRE V**

### **Fabrication et caractérisation de minigranules à désintégration rapide**



## 1. Introduction

Un médicament destiné à l'enfant nécessite une présentation galénique spécifique et adaptée aux caractéristiques de son âge pour permettre une administration simple et sûre. Les principaux challenges à affronter dans la conception d'une telle forme galénique constituent la flexibilité de dosage et la facilité d'administration [1–3]. En effet, les enfants représentent une population très hétérogène qui varie énormément entre les individus et progressivement au cours de leur croissance, en ce qui concerne la taille, le poids et le stade de maturation physiologique [4–6]. Le traitement thérapeutique chez l'enfant devrait par conséquent s'adapter à ces changements en termes de posologie, d'où l'exigence de formes galéniques à dosage flexible. L'adaptation de la forme galénique est d'autant plus nécessaire pour les enfants en bas âge. Les formes orales solides classiques, comme des comprimés ou gélules, ne sont pourtant pas des formes appropriées aux enfants de moins de six ans qui ont difficulté à les avaler ou les croquer en raison de leur consistance et de leur taille relativement importante. Les formes orales liquides semblant plus avantageuses présentent néanmoins certaines restrictions, à savoir la stabilité physicochimique et microbiologique, l'administration d'un grand volume en cas de posologie importante.

Le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) concernant l'adaptation des formes galéniques aux besoins de la population pédiatrique recommande les formes orales solides de taille réduite, comme des mini-comprimés ou des formes multiparticulaires, qui sont orodispersibles [7]. Un véritable intérêt des systèmes multiparticulaires est la facilité d'ajuster la dose éventuellement à l'aide d'un dispositif sans besoin de manipulation supplémentaire. D'autre part, les formes orodispersibles gagnent actuellement beaucoup de considération dans la recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et représentent un choix de formulation justifié pour administrer un médicament chez l'enfant. En effet, une fois placé dans la bouche, le produit subit une désintégration très rapide au contact de la salive et devient donc une sorte de solution ou suspension que va avaler l'enfant.

Dans ce contexte, le but de notre travail est d'évaluer la faisabilité de produire des minigranules à désintégration rapide par une nouvelle approche, s'agissant de l'extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Les minigranules obtenus sont ensuite caractérisés par différentes techniques, à savoir la détermination du temps de

désintégration par analyseur de texture, la caractérisation de la porosité par intrusion de mercure et adsorption gazeuse, etc.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matières premières

L'acétaminophène a été utilisé comme principe actif modèle et la cellulose microcristalline (Avicel PH 101) comme excipient aidant à extruder/sphéroniser. La répartition granulométrique mesurée par diffraction laser (Mastersizer S, Malvern Instrument, Orsay, France) est présentée ci-dessous.

**Tableau V-1: Répartition granulométrique des matières premières (en  $\mu\text{m}$ ).**

	Fabricant	D[4, 3]	D(v, 0.1)	D(v, 0.5)	D(v, 0.9)
Acétaminophène	Cooper (Melun, France)	11,64	1,85	7,24	27,96
Avicel PH 101	FMC (Cork, Irlande)	62,30	14,49	53,57	122,83

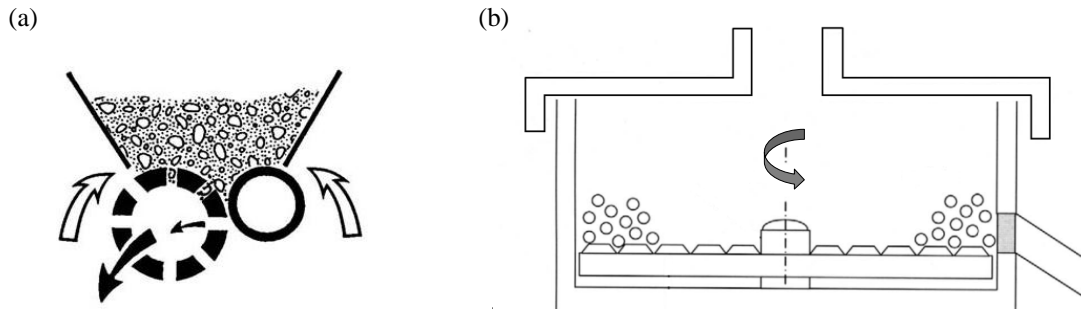
D[4, 3] est le diamètre moyen en volume; D(v, 0.5) est le diamètre médian; D(v, 0.1) et D(v, 0.9) sont les diamètres sous lesquels se trouvent 10 et 90% des particules, respectivement.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Fabrication de minigranules

Les minigranules sont obtenus par extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Un mélange de 100 g d'un mélange de principe actif (25, 50 et 75%) et d'Avicel PH 101 est effectué dans un mélangeur Turbula (Bachofen, Basel, Suisse) pendant 10 minutes. La masse humide est préparée en ajoutant de l'eau déminéralisée (liquide de mouillage) sous agitation dans un mélangeur planétaire (Kenwood, Croydon, Angleterre) pendant 5 minutes. L'extrusion se réalise sur un extrudeur à cylindres Alexanderwerk GA 65 (Remscheid, Allemagne). Cet appareil est équipé de deux cylindres tournant en sens inverse: l'un est plein et l'autre est perforé (diamètre de l'orifice = 1 mm). La masse humide est introduite entre les deux cylindres par gravité. La vitesse de rotation des cylindres est fixée à 96 tours/minute (Figure V-1a). Les extrudats sont sphéronisés par un sphéroniseur Caleva modèle 15 (Dorset, Angleterre) équipé d'un plateau rainuré avec des pyramides tronquées tournant à 765 tours/minute pendant 1 minute (Figure V-1b). Les minigranules sont ensuite lyophilisés afin d'éliminer l'eau. L'appareil utilisé est un lyophilisateur Epsilon 2-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Allemagne). Les étapes de lyophilisation comprennent la congélation ( $-45^{\circ}\text{C}$  pendant 2 heures), la sublimation ( $-10^{\circ}\text{C}$  pendant 10 heures) et la dessiccation secondaire ( $20^{\circ}\text{C}$  pendant 10 heures) s'effectuant

sous vide. Les minigranules séchés sont conservés à 20°C dans un dessiccateur contenant du silicagel.



**Figure V-1:** Représentation schématique de l'extrudeur à cylindres et du sphéronisateur.

### 2.2.2. Perte à la dessiccation

L'essai destiné à déterminer le taux d'humidité des minigranules après lyophilisation est réalisé par un dessiccateur infrarouge (Mettler Toledo, Viroflay, France). Environ 3 g de minigranules sont pesées avant et après un cycle de chauffage à 105°C pendant 30 minutes. Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage (m/m) (perte de masse par rapport à la masse initiale).

### 2.2.3. Analyse granulométrique par tamisage

La répartition de taille des minigranules est effectuée par tamisage. Les tamis analytiques sont empilés les uns sur les autres par ordre décroissant de l'ouverture des mailles, soit 2000, 1676, 1250, 1000, 710 et 500  $\mu\text{m}$ . Les minigranules sont placés sur le tamis supérieur et soumis à agitation horizontale durant 10 minutes à l'aide d'une tamiseuse Retsch (Eragny sur Oise, France). Après agitation, la quantité de minigranules retenus sur chaque tamis est pesée.

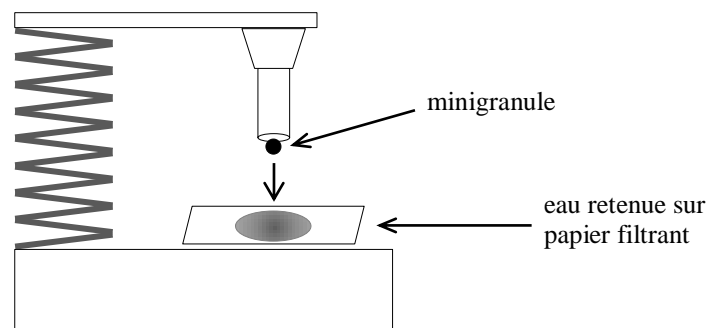
### 2.2.5. Rapport d'élongation

Le rapport d'élongation est égal au rapport de la plus grande dimension sur la plus petite dimension d'un minigranule prise perpendiculairement. Plus ce rapport est proche de 1, plus la forme s'approche de la sphéricité. L'essai est réalisé à l'aide d'un stéréomicroscope Nikon SMZ-800 (Melville, Etats-Unis) équipé d'une caméra AxioCam ICc1 et du logiciel AxioVision LE (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Les mesures sont répétées sur 50 minigranules de la fraction 1000 – 1250  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2.4. Friabilité

La friabilité est définie comme une réduction de masse ou la formation de fragments de minigranules, survenant lorsqu'elles sont soumises à des sollicitations mécaniques durant la manipulation (chute, vibration, fluidisation, etc.). L'abrasion, la rupture ou la déformation sont des exemples de changements présentés par les minigranules. Le test consiste à placer 5 g de minigranules (fraction 1000 – 1250  $\mu\text{m}$ ) + 5 g de billes en inox (1 mm en diamètre) dans un récipient en verre de 30 mL. Ce dernier est soumis à des oscillations à l'aide du mélangeur Turbula (Bachofen, Basel, Suisse) tournant à 27 tours/min durant 5 minutes. Les masses des minigranules sont déterminées avant et après le test lorsque les particules fines sont éliminées par tamisage avec un tamis ayant une ouverture de maille de 355  $\mu\text{m}$ . La friabilité est exprimée en pourcentage (m/m) soit la perte en masse par rapport à la masse initiale.

#### 2.2.6. Détermination du temps de désintégration par analyseur de texture



**Figure V-2:** Installation expérimentale pour le test de détermination du temps de désintégration par analyseur de texture.

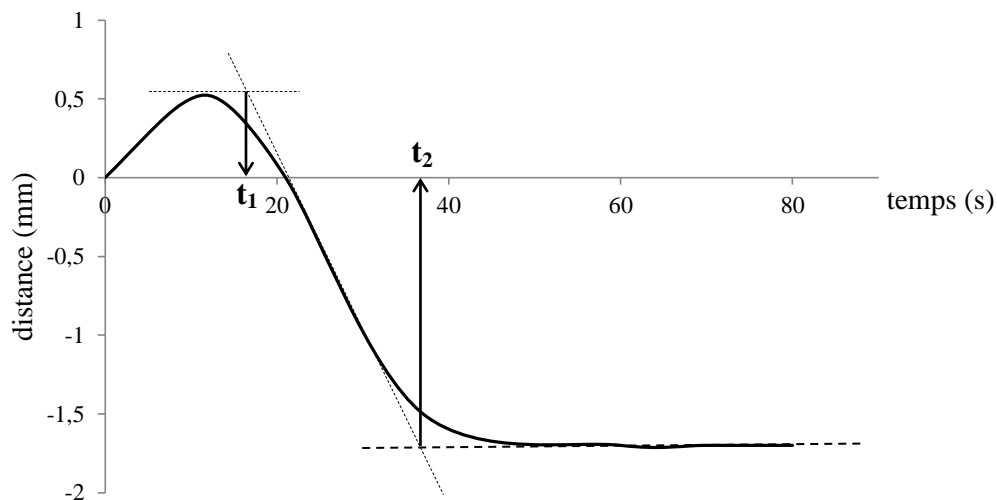
Le temps de désintégration des minigranules est déterminé *in vitro* à l'aide d'un analyseur de texture TA.XT Plus (Stable Micro System, Surrey, Angleterre) en s'inspirant de la méthode décrite par [8], [9]. L'appareil est calibré avec un capteur de force d'un kg et équipé d'une sonde cylindrique P/3 à fond plat dont le diamètre de surface est de 3 mm. La méthode consiste à fixer un minigranule au fond plat de la sonde qui se déplace vers le bas au cours de l'analyse. Dès que le minigranule est en contact avec le milieu de désintégration et qu'une force minimale de l'ordre de 10 g est détectable, la sonde applique, de façon constante, une force de compression de 50 g sur le minigranule pendant 60 secondes. Lorsque le minigranule commence à se désintégrer, la sonde doit s'enfoncer afin de maintenir la valeur de force constante et l'appareil enregistre la distance de pénétration de la sonde dans l'échantillon en fonction du temps. Pour simuler les

conditions *in vivo*, un très faible volume de milieu de désintégration est utilisé en ajoutant 20  $\mu\text{L}$  d'eau distillée sur un petit morceau de papier filtrant (1 x 1 cm en dimension). Le test s'effectue à la température ambiante. La Figure V-2 représente l'installation expérimentale pour le test.

La courbe distance-temps caractérise le comportement du minigranule au cours de la désintégration (Figure V-3), qui présente trois phases distinctes: (i) la phase initiale représente la résistance de l'échantillon à la force de compression appliquée via la sonde et peut indiquer un certain gonflement du minigranule, ce qui se traduit par les valeurs de distance positives ; (ii) la descente de la courbe représente la phase de désintégration, où l'échantillon commence à se désintégrer et que la sonde doit s'enfoncer davantage afin de maintenir la valeur de force constante; (iii) enfin, lorsque le minigranule est complètement désintégré, la courbe représente un plateau. En se basant sur la courbe distance-temps, les paramètres ci-dessous peuvent être déterminés:

- point de début de la désintégration ( $t_1$ ) étant la projection sur l'axe X de l'interception des tangentes de la phase initiale et de la phase descendante;
- point de fin de la désintégration ( $t_2$ ), également défini comme temps de désintégration, étant la projection sur l'axe X de l'interception des tangentes de la deuxième phase et du plateau.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de 20 mesures sur les minigranules de la fraction 1000 – 1250  $\mu\text{m}$ .



**Figure V-3:** Courbe distance-temps caractéristique des trois phases distinctes de désintégration à partir desquelles le point de début ( $t_1$ ) et le point de fin ( $t_2$ ) de désintégration peuvent être extrapolés.

### 2.2.7. Essai de dissolution

L'essai de libération *in vitro* du principe actif est effectué avec l'appareil à palette USP type 2 (Sotax, Allschwil, Suisse). 500 mg de minigranules (fraction 1000 – 1250 µm) sont introduits dans 900 mL d'eau distillée (milieu de dissolution) à  $37 \pm 0,5$  °C. La vitesse de rotation de pale est de 100 tours/min. Les prélèvements sont pris avec un intervalle de 5 minutes jusqu'à 45 minutes. La quantité du principe actif libéré est dosée par HPLC selon la méthode décrite précédemment. Les résultats sont exprimés par la moyenne de 6 essais.

### 2.2.8. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La morphologie de surface et de section des minigranules est observée par MEB (Hitachi S47000 apparatus, Tokyo, Japan) fonctionnant avec une tension d'accélération de 3 kV. La surface d'observation de l'échantillon est auparavant couverte par une fine couche de carbone. La section de minigranules est réalisée au moyen d'une lame de rasoir.

### 2.2.9. Porosimétrie par intrusion de mercure

Le principe repose sur la mesure du volume d'un liquide non mouillant (le mercure), qui peut pénétrer des pores en fonction de la pression appliquée. La pression à appliquer est inversement proportionnelle au diamètre intérieur de l'orifice des pores. En assimilant les pores comme des capillaires cylindriques de section circulaire, la corrélation entre diamètre de pore et pression est donnée par l'équation de Washburn:

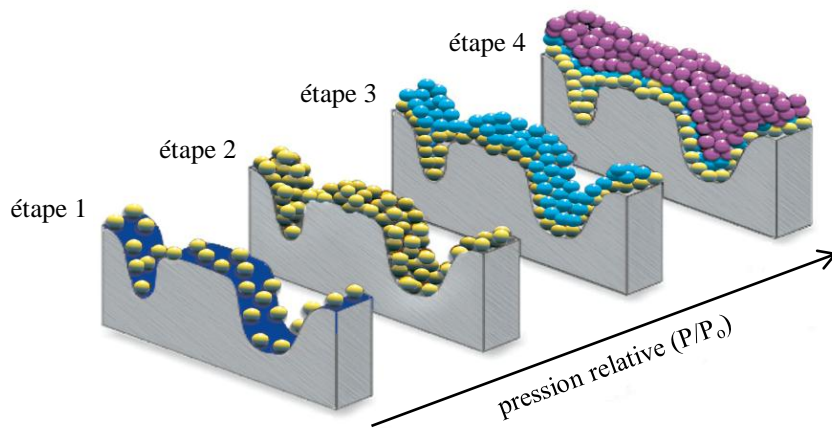
$$d = - \frac{4 \cdot \sigma_{Hg}}{P} \cos \theta_{Hg}$$

où  $d$  (m) est le diamètre de pore;  $\sigma_{Hg}$  (N/m) la tension superficielle;  $\theta_{Hg}$  (°) l'angle de contact du mercure sur l'échantillon et  $P$  (Pa) la pression appliquée.

L'essai est réalisé au moyen d'un porosimètre à intrusion de mercure Micromeritics modèle 9400 (Georgia, Etats-Unis). L'échantillon est mis sous vide pendant une nuit pour éliminer l'humidité et les contaminants adsorbés avant d'être analysé. Une quantité d'échantillon précisément pesée est introduite dans le pénétromètre. Le vide suivi du remplissage du pénétromètre avec le mercure est ensuite effectué. La pression appliquée varie de 0,004 à 200 MPa correspondant à la taille des pores de 250 à 0,006 µm. Les valeurs de l'angle de contact et de la tension superficielle du mercure sont supposées constantes et respectivement égaux à 130° et 0,485 N/m.

### 2.2.10. Méthode d'adsorption gazeuse

La technique est basée sur le phénomène d'absorption physique d'un gaz sur un solide. L'adsorption physique est le résultat d'interactions relativement faibles et réversibles (forces de van der Waals) entre les molécules gazeuses et les atomes de la surface. Lors de l'analyse, l'échantillon est exposé au gaz de mesure, par exemple l'azote, à la température de condensation du gaz. La quantité de gaz adsorbé à la surface du solide augmente avec l'augmentation de la pression relative  $P/P_0$  (Figure V-4).



**Figure V-4:** Phénomène d'adsorption physique d'un gaz sur un solide se produisant étape par étape en fonction de la pression relative ( $P/P_0$ ): adsorption des molécules de gaz isolées à la surface (étape 1), adsorption en monocouche (étape 2) et en multicouche (étape 3), condensation capillaire avec le remplissage des pores (étape 4) (selon [10]).

#### Détermination de la surface spécifique

La détermination de la surface spécifique repose sur le calcul de la quantité de gaz adsorbé (exprimée en volume) sous forme d'une monocouche à la surface du solide selon l'équation:

$$S = \frac{V_m N \alpha}{m \cdot 22400}$$

où  $V_m$  (mL) est le volume de gaz adsorbé qui, dans les conditions normales de température et de pression (273,15 K et pression atmosphérique  $1,013 \times 10^5$  Pa), produit une monocouche apparente en surface de l'échantillon;  $N$  le nombre d'Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$ /mol);  $\alpha$  la section effective d'une molécule du gaz de mesure ( $0,162 \text{ nm}^2$  pour l'azote);  $m$  (g) la masse de l'échantillon et 22400 (mL) le volume occupé par 1 mole de gaz de mesure dans les conditions normales de température et de pression.

Le volume de gaz adsorbé est déduit à l'aide de l'équation des isothermes d'adsorption de Brunauer, Emmett et Teller (BET):

$$\frac{1}{\left[V_{\alpha} \left(\frac{P}{P_0} - 1\right)\right]} = \frac{C - 1}{V_m C} \times \frac{P}{P_0} + \frac{1}{V_m C}$$

où  $P$  (Pa) est la pression de vapeur partielle du gaz de mesure à l'équilibre avec la surface à la température de condensation du gaz (77,4 K pour l'azote);  $P_0$  (Pa) la pression de saturation du gaz de mesure;  $V_{\alpha}$  (mL) le volume de gaz adsorbé dans les conditions normales de température et de pression et  $C$  la constante sans dimension en rapport avec l'enthalpie d'adsorption du gaz en surface de l'échantillon.

#### *Analyse des pores par adsorption gazeuse*

La condensation capillaire du gaz dans un système poreux se produit lors des pressions relatives élevées. Le remplissage des pores se fait par l'ordre croissant du rayon de pore en augmentant la pression relative, ce qui est à l'inverse de l'intrusion de mercure. En supposant des pores cylindriques de section circulaire, le rayon de pore est donné par l'équation de Kelvin s'appliquant à un liquide mouillant (l'azote liquide):

$$r = -\frac{V}{RT} \times \frac{2 \cdot \sigma_{N_2}}{\ln(P/P_0)} \cos \theta_{N_2}$$

où  $r$  (m) est le rayon de pore;  $V$  (L/mol) le volume molaire du gaz;  $T$  (K) la température de gaz;  $R$  la constante des gaz parfait;  $\sigma_{N_2}$  (N/m) la tension superficielle;  $\theta_{N_2}$  (°) l'angle de contact du gaz liquide sur le solide.

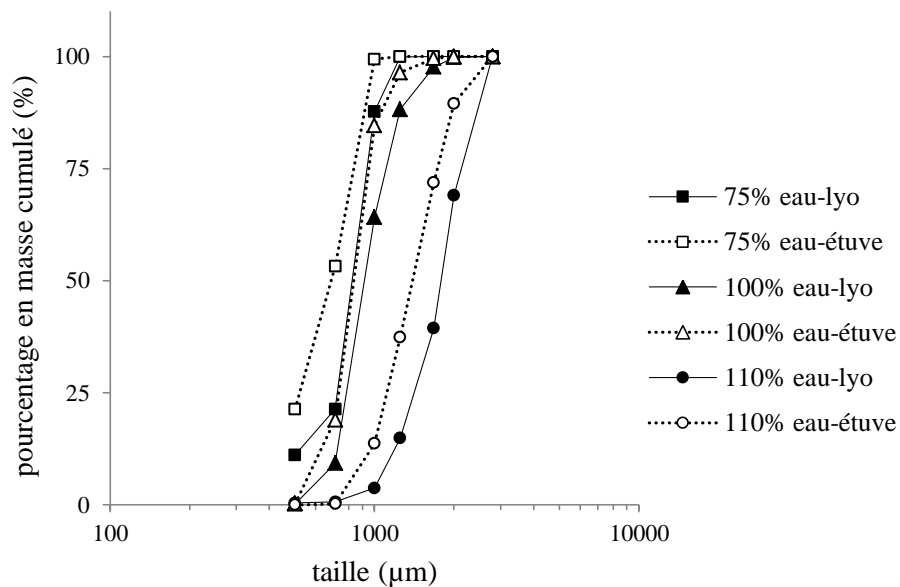
L'appareil utilisé est un analyseur ASAP 2010 (Micromeritics, Georgia, Etats-Unis) utilisant l'azote comme gaz de mesure. L'échantillon est mis sous vide pendant une nuit pour éliminer de l'humidité et des contaminants adsorbés avant d'être analysé. L'analyse est effectuée à la température de condensation de l'azote (77,4 K) dans la gamme de pression relative de 0,069 à 0,200 pour la détermination de la surface spécifique et de 0,231 à 0,995 pour la mesure de la distribution de taille des pores.



### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Minigranules neutres à base d'Avicel

Les essais préliminaires consistent à évaluer la faisabilité de produire des minigranules par lyophilisation qui se désintègrent rapidement en contact avec de l'eau. Pour cela, des minigranules à base d'Avicel seul sont préparés et séchés par deux méthodes, soit par lyophilisation soit par séchage à l'étuve (60°C pendant 24 heures). La quantité d'eau utilisée lors du mouillage a été variée de 75, 100 et 110% (m/m) par rapport à la quantité d'Avicel. Ces pourcentages d'eau permettaient d'obtenir les minigranules de qualité acceptable, c'est-à-dire de forme sphérique et régulière. Les taux d'humidité déterminés sont comparables entre les lots de minigranules et sont inférieurs à 2% quelle que soit la méthode de séchage.



**Figure V-5:** Analyse granulométrique des minigranules d'Avicel obtenues par deux méthodes de dessiccation: lyophilisation (lyo) et séchage à l'étuve.

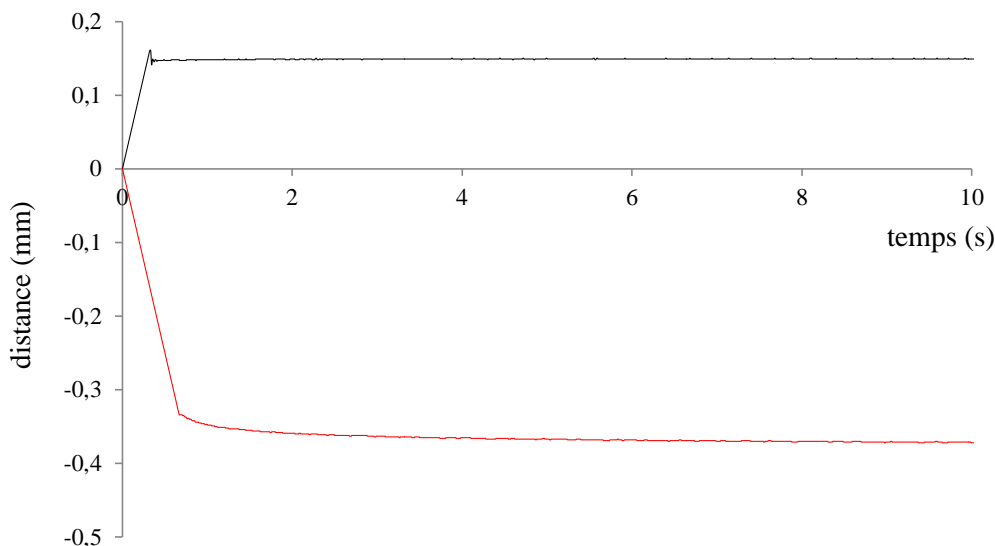
Il est évident que la taille des minigranules est dépendante de la quantité de liquide de mouillage et de la méthode de séchage (Figure V-5). L'augmentation de la quantité de liquide de mouillage produit des minigranules de taille supérieure, ce qui est en accord avec la littérature [11–13]. En effet, l'eau étant lubrifiant et plastifiant facilite l'extrusion de la masse humide. Une faible quantité d'eau peut favoriser l'irrégularité de la surface des extrudats (formation d'écailles) où se fera préférentiellement le découpage lors de la sphéronisation. Cela aboutit davantage à la fragmentation des extrudats et/ou à la production de fines. En plus, le pouvoir liant donné par des liaisons liquides augmente avec le taux du liquide de mouillage et donc peut limiter le découpage et/ou provoquer

l'agglomération des extrudats au cours de la sphéronisation. D'autre part, la méthode de séchage a été montrée avoir impact sur les propriétés des minigranules [14–16]. La cellulose microcristalline se comporte comme une sorte d'éponge qui est capable d'absorber une grande quantité d'eau [17]. Au cours de la lyophilisation, l'eau est emprisonnée à l'état de glace due à la congélation dans les capillaires et les pores internes de la masse. La sublimation qui suit crée des espaces vides à la place de l'eau. La forme et la taille des minigranules restent intactes et comparables à celles avant séchage. Une légère augmentation de taille peut être constatée due à la dilatation de l'eau en passant de l'état liquide au solide [15]. Par contre, l'évaporation de façon progressive de l'eau par séchage à l'étuve aboutit au phénomène de rétrécissement de la masse humide. Les minigranules obtenus sont en conséquence de taille plus petite comparativement à ceux obtenus par lyophilisation.

Selon la Pharmacopée Européenne, les formes orodispersibles sont destinées à être placées dans la bouche où elles se désintègrent rapidement avant d'être avalées, généralement en moins de 3 minutes. La méthode utilisant l'analyseur de texture pour déterminer le temps de désintégration a été décrite par [8], [9]. L'avantage de cette approche est de pouvoir simuler les conditions réelles dans la bouche où la forme galénique est en contact avec peu de liquide et soumise à un certain impact de force mécanique. Elle permet également de mesurer quantitativement un temps de désintégration très court plutôt que d'avoir une simple observation visuelle comme c'est le cas avec d'autres techniques. De plus, cette méthode analytique est puissante en termes de pouvoir discriminant, en permettant de distinguer l'influence des paramètres provenant de la forme galénique grâce au profil de désintégration (courbe distance-temps) [9]. C'est la raison pour laquelle nous avons développé cette méthode afin de déterminer le temps de désintégration des minigranules.

Avant l'analyse, différents volumes de milieu de désintégration (eau distillée) ont été testés, variant de 20 à 100  $\mu\text{L}$ . Il n'y a pas de différence significative entre les volumes utilisés. Pour être proche des conditions *in vivo*, le volume de 20  $\mu\text{L}$  a été choisi. Il est également important de valider la méthode en ce qui concerne la force de compression. La Figure V-6 montre les courbes distance-temps correspondant au comportement des minigranules quand ils sont soumis à la force utilisée de 50 g. Le minigranule, en absence d'eau, se montre résistant à la contrainte appliquée d'où les valeurs de distance positives et, il reste intact après le test. Au contraire, le minigranule se désintègre en présence d'eau

alors que la sonde s'enfonce davantage pour maintenir la valeur de force constante. Ceci est illustré par la descente de la courbe distance-temps. D'autre part, nous ne constatons aucun gonflement au début de la désintégration, car la cellulose microcristalline, en absorbant de l'eau, la contient dans les pores particulières avec le moindre gonflement [12].



**Figure V-6:** Courbes distance-temps des minigranules d'Avicel PH 101 soumis à la force de compression en présence d'eau (courbe en rouge) et en absence d'eau (courbe en noir).

Le Tableau V-2 présente les résultats du test de désintégration, avec  $t_1$  représentant le point de début et  $t_2$  le point de fin de la désintégration qui sont déterminés à partir de la courbe distance-temps.

**Tableau V-2:** Caractéristiques des minigranules à base d'Avicel.

		75% eau-lyo	100% eau-lyo	110% eau-lyo
Essai de désintégration				
$t_1$ (s)	min	0,00	0,00	0,00
	max	1,10	2,74	2,38
	moyenne	0,22	0,49	0,57
$t_2$ (s)	min	0,27	0,26	0,43
	max	1,29	2,89	3,46
	moyenne	0,56	0,88	1,19
Friabilité (%)		0,51	0,24	0,10

Il est intéressant de relever que les minigranules préparés par lyophilisation manifestent une désintégration qui débute presque immédiate lors du contact avec de l'eau ( $t_1$  est autour de 0 seconde) et se désintègrent complètement en un très court laps de temps ( $t_2$  est de

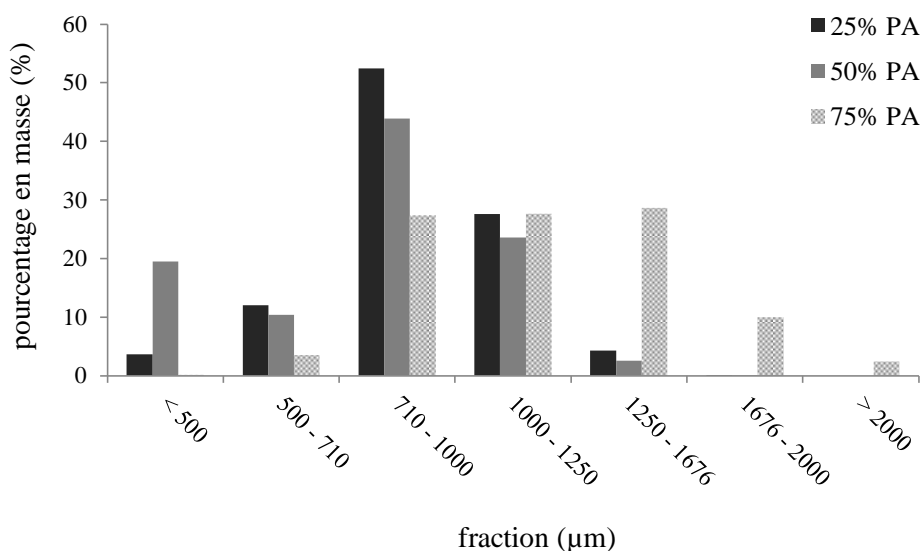
moins de 5 secondes). Ce n'est pas le cas de minigranules séchés à l'étuve, qui ne se désintègrent pas après le test soit 60 secondes. Ceci pourrait être expliqué par la structure plus poreuse des minigranules obtenus par lyophilisation. Après lyophilisation, l'eau est plus accessible au sein du minigranule par des forces capillaires et favorise par conséquent la désintégration [18]. Au contraire, les minigranules séchés à l'étuve étant plus denses, cela ne facilite pas l'entrée de l'eau.

Il convient de noter qu'il n'y a pas de différence significative entre les lots de minigranules préparés avec différentes quantités de liquide du mouillage, pour une méthode donnée de séchage. En particulier, les minigranules s'avèrent satisfaisants en termes de propriétés mécaniques avec une friabilité assez faible, de moins de 1% (Tableau V-2). Ceci est important pour que les minigranules soient résistants aux sollicitations mécaniques durant la manipulation (chute, vibration, fluidisation, etc.).

### ***3.2. Minigranules contenant du principe actif***

A la vue de la faisabilité de minigranules neutres d'Avicel PH 101 à désintégration rapide obtenus par extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation, nous avons envisagé la fabrication et caractérisation de minigranules contenant un principe actif modèle étant l'acétaminophène.

Les minigranules ont été préparés avec différents taux de principe actif, soit 25, 50 et 75% (m/m). La quantité du liquide de mouillage a été adaptée au pourcentage de principe actif pour obtenir des minigranules de qualité acceptable, soit 100, 110 et 200% d'eau (m/m) par rapport à la quantité d'Avicel, respectivement. La Figure V-7 représente la répartition granulométrique des minigranules des trois lots obtenus. Seule la fraction de 1000 – 1250  $\mu\text{m}$  est retenue pour les analyses qui suivent.



**Figure V-7:** Analyse granulométrique des minigranules contenant du principe actif (PA).

Le Tableau V-3 récapitule les caractéristiques de ces minigranules concernant le taux d'humidité, la friabilité, le rapport d'élongation et la désintégration.

**Tableau V-3:** Caractéristiques des minigranules contenant du principe actif (PA).

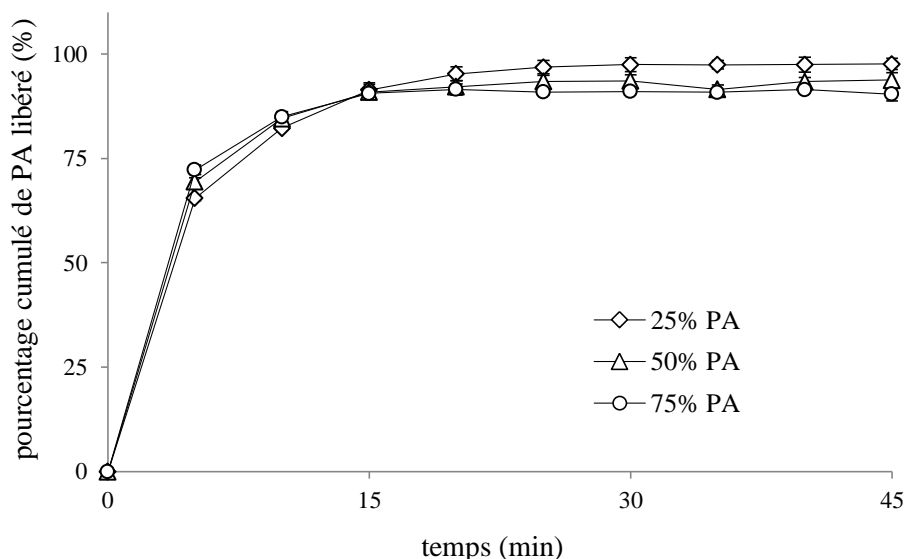
	25% PA	50% PA	75% PA
Taux d'humidité (%)	1,00	0,40	0,51
Friabilité (%)	0,24	0,20	0,35
Rapport d'élongation	1,09	1,07	1,08
Essai de désintégration			
t <sub>1</sub> min	0,00	0,00	0,00
max	0,43	0,32	0,25
moyenne	0,07	0,02	0,03
t <sub>2</sub> min	0,26	0,28	0,30
max	1,54	1,33	2,08
moyenne	0,95	0,85	1,30

La résistance mécanique des minigranules s'avère satisfaisante après incorporation du principe actif vu que la friabilité est inférieure à 1%. Le rapport d'élongation permet d'évaluer l'acceptabilité des minigranules en termes de sphéricité. Plus ce rapport est proche de 1, plus la forme s'approche de la sphéricité. Comme nous pouvons le constater dans la Figure V-8, les minigranules observés au stéréo-microscope se montrent relativement sphériques avec une surface assez lisse.



**Figure V-8:** Observation des minigranules contenant du principe actif (PA) au stéréo-microscope.

Il est aussi important de noter que les minigranules contenant du principe actif se désintègrent presque immédiatement lors du contact avec d'eau avec le point de début  $t_1$  et le point de fin  $t_2$  de la désintégration qui sont respectivement autour de 0 seconde et moins de 5 secondes. Il en résulte ainsi une libération rapide du principe actif: le taux de principe actif libéré atteint plus de 90% après 15 minutes pour les trois lots de minigranules (Figure V-9).



**Figure V-9:** Profils de dissolution des minigranules contenant du principe actif (PA).

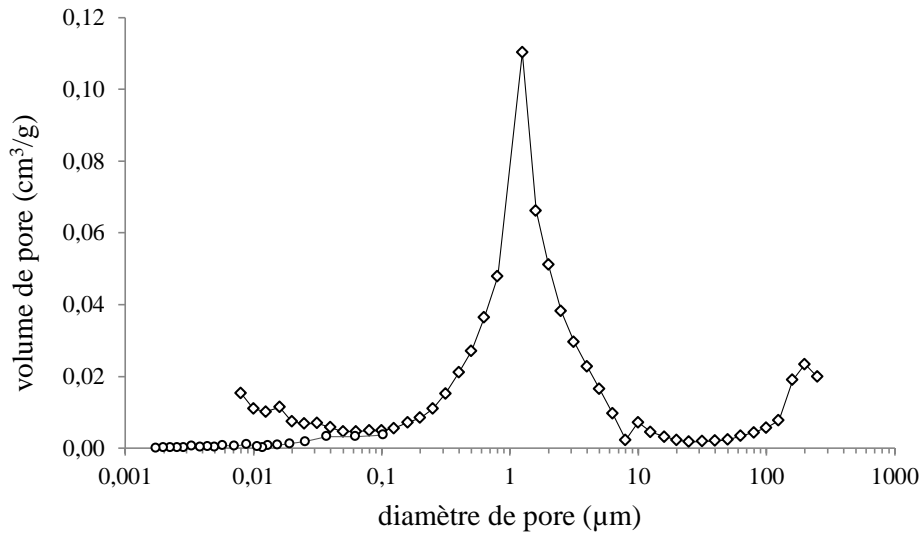
En résumé, le procédé d'extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation représente une nouvelle approche qui permet de produire des minigranules de qualité appropriée pour une forme orodispersible, soit bonne sphéricité, faible friabilité, capacité d'incorporer une quantité importante de principe actif et surtout une désintégration très rapide.

Les approches fondamentales appliquant les technologies actuelles en vue de concevoir une forme à désintégration rapide consistent en l'incorporation d'agents super-désintégrants ou la création d'une porosité au sein de la forme galénique [19], [20]. Dans le cas de cette dernière technique, la pénétration de l'eau se fait rapidement par des forces capillaires via des pores, ce qui est nécessaire pour que la désintégration se produise [18]. La lyophilisation s'apparente à la technique permettant de former une structure fortement poreuse grâce à la sublimation de l'eau lorsqu'elle est à l'état de glace ce qui permet de créer des pores vides [21], [22]. Le procédé classique de lyophilisation d'une solution ou suspension présente des inconvénients étant donné que le produit final est très friable et qu'il est difficile à manipuler, car la taille des pores formés est relativement grande, de l'ordre de dizaines de microns [23–26]. Par conséquent, la porosité peut jouer un rôle important sur la désintégration mais également sur les propriétés mécaniques.

Dans la suite de ce travail, nous avons examiné les caractéristiques de porosité des minigranules lyophilisés contenant 25% de principe actif au moyen de la porosimétrie par intrusion de mercure et de la méthode d'adsorption gazeuse. Les images MEB ont également été analysées en parallèle. Chaque technique permet d'évaluer des gammes de

taille de pore différentes: ainsi, les pores de taille plus grande (0,006 – 250  $\mu\text{m}$ ) sont accessibles par la méthode d'intrusion de mercure alors que les pores de diamètre plus petit (0,001 – 0,1  $\mu\text{m}$ ) sont mesurables par la méthode d'adsorption gazeuse [18], [27–30].

La Figure V-10 représente la distribution de taille des pores déterminée par ces deux techniques qui trace le volume des pores dans la tranche de diamètre correspondant.



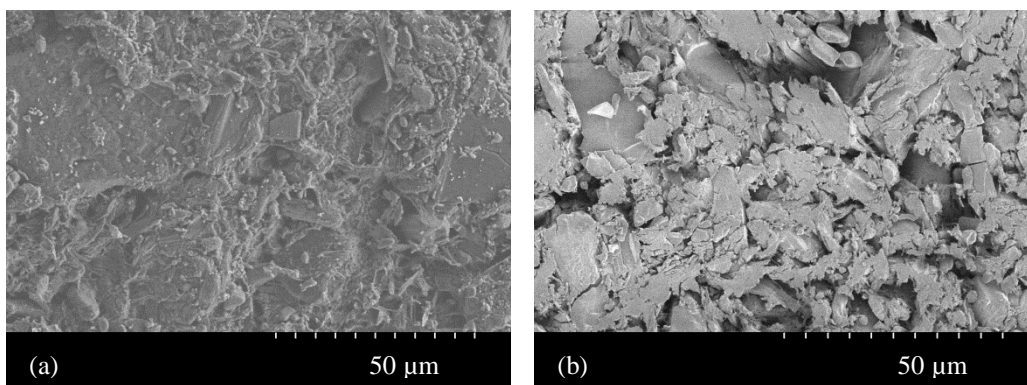
**Figure V-10:** Distribution de taille des pores déterminée par les méthodes de l'intrusion de mercure (◇) et de l'adsorption de l'azote (○).

La fraction des pores apparaissant dans les tranches de diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$  pourrait être attribuée aux espaces inter-granulaires entre les minigranules dans le pénétromètre. D'autre part, la méthode d'adsorption de gaz montre une faible présence de pores de taille inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$  alors que la courbe s'accroît dans le cas de l'intrusion de mercure. Ceci peut être expliqué par le fait que la pénétration du mercure dans l'échantillon se réalise par le mécanisme de percolation d'invasion en tenant compte de la structure spatiale de porosité. C'est-à-dire, l'envahissement du mercure se fait naturellement à partir de la surface de l'échantillon. A une pression donnée, les pores dont le diamètre est suffisant sont effectivement remplis; néanmoins la pénétration laisse de côté une partie de pores potentiellement remplissables mais situés trop loin de la surface pour être atteints par le mercure. Le remplissage de ces pores ne peut avoir lieu qu'à une pression plus élevée. Dans notre cas, la fraction des pores de taille théorique inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$  pourrait être contribué par des pores de taille supérieure mais situés plus au centre des minigranules. La méthode d'absorption de gaz semble plus pertinente pour interpréter la distribution des pores de taille inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ . Nous constatons que la structure



interne des minigranules lyophilisés se caractérise principalement par des pores dont le diamètre varie entre 0,1 à 20  $\mu\text{m}$  avec un médian de l'ordre de 1,19  $\mu\text{m}$ . De plus, la porosité déterminée par intrusion de mercure est de 52% et la surface spécifique par adsorption de gaz est de 6,04  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Comme nous pouvons le constater dans la Figure V-11, la surface des minigranules présente une certaine rugosité mais reste acceptable alors que l'image de section montre la structure plutôt capillaire, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par la porosimétrie au mercure et la méthode d'adsorption gazeuse.



**Figure V-11:** Images MEB de la surface (a) et de la section (b) de minigranules contenant 25% de principe actif.

L'étude des caractéristiques de la porosité des minigranules lyophilisés indique un équilibre entre les propriétés de désintégration et de résistance mécanique. La présence des pores capillaires favorise la pénétration de l'eau dans les minigranules pour exercer une désintégration très rapide; la taille des pores reste à la fois adéquate pour maintenir la propriété mécanique suffisante.

#### 4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons élaboré une nouvelle approche afin de fabriquer des minigranules à désintégration rapide. Il s'agit de l'extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Les minigranules obtenus ont été caractérisés. Ils présentent des propriétés mécaniques satisfaisantes et se désintègrent de façon immédiate lors du contact avec de l'eau grâce à leur structure interne poreuse. A l'aide d'un dispositif de dosage, comme par exemple un distributeur volumétrique, ce type de minigranules promet une forme galénique adaptée à la population pédiatrique grâce à une facilité d'administration et une flexibilité de dosage.

**Références**

- [1] E. Schirm, H. Tobi, T. W. de Vries, I. Choonara, and L. T. W. De Jong-van den Berg, “Lack of appropriate formulations of medicines for children in the community,” *Acta Paediatr.*, vol. 92, no. 12, pp. 1486–1489, 2003.
- [2] T. Nunn and J. Williams, “Formulation of medicines for children,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 59, no. 6, pp. 674–676, 2005.
- [3] J. Breitzkreutz and J. Boos, “Paediatric and geriatric drug delivery,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 4, no. 1, pp. 37–45, 2007.
- [4] A. Bowles, J. Keane, T. Ernest, D. Clapham, and C. Tuleu, “Specific aspects of gastro-intestinal transit in children for drug delivery design,” *Int J Pharm*, vol. 395, no. 1–2, pp. 37–43, 2010.
- [5] A. Dotta, A. Braguglia, and G. Salvatori, “Pharmacological research in neonatology,” *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, vol. 24 Suppl 1, pp. 44–46, 2011.
- [6] H. W. Seyberth and R. E. Kauffman, “Basics and dynamics of neonatal and pediatric pharmacology,” *Handb Exp Pharmacol*, vol. 205, pp. 3–49, 2011.
- [7] “Report of the informal expert meeting on dosage forms of medicines for children.” OMS, 2008.
- [8] P. J. Dor and J. A. Fix, “In vitro determination of disintegration time of quick-dissolve tablets using a new method,” *Pharm Dev Technol*, vol. 5, no. 4, pp. 575–577, 2000.
- [9] S. K. El-Arini and S. D. Clas, “Evaluation of disintegration testing of different fast dissolving tablets using the texture analyzer,” *Pharm Dev Technol*, vol. 7, no. 3, pp. 361–371, 2002.
- [10] “Gas adsorption theory,” *Micromeritics*. [Online]. Available: <http://www.micromeritics.com/Library/Scientific-Posters.aspx>.
- [11] L. Hasznos, I. Langer, and M. Gyarmathy, “Some factors influencing pellet characteristics made by an extrusion/spheronisation process - Part I: Effects on size characteristics and moisture content decrease of pellets,” *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 18, no. 4, pp. 409–437, 1992.
- [12] L. S. C. Wan, P. W. S. Heng, and C. V. Liew, “Spheronization conditions on spheroid shape and size,” *Int J Pharm*, vol. 96, no. 1–3, pp. 59–65, 1993.
- [13] S. L. Rough and D. I. Wilson, “Extrudate fracture and spheronisation of microcrystalline cellulose pastes,” *Journal of Materials Science*, vol. 40, no. 16, pp. 4199–4219, 2005.
- [14] P. Kleinebudde, “Shrinking and swelling properties of pellets containing microcrystalline cellulose and low substituted hydroxypropylcellulose - I. Shrinking properties,” *Int J Pharm*, vol. 109, no. 3, pp. 209–219, 1994.
- [15] A. B. Bashaiwoldu, F. Podczeck, and J. M. Newton, “A study on the effect of drying techniques on the mechanical properties of pellets and compacted pellets,” *Eur J Pharm Sci*, vol. 21, no. 2–3, pp. 119–129, 2004.
- [16] B. Song, S. L. Rough, and D. I. Wilson, “Effects of drying technique on extrusion-spheronisation granules and tablet properties,” *Int J Pharm*, vol. 332, no. 1–2, pp. 38–44, 2007.

- [17] K. E. Fielden, J. M. Newton, P. O'Brien, and R. C. Rowe, "Thermal studies on the interaction of water and microcrystalline cellulose," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 40, no. 10, pp. 674–678, 1988.
- [18] D. Faroongsarng and G. E. Peck, "The role of liquid water uptake by an insoluble tablet containing a disintegrant," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 20, no. 10, pp. 1777–1794, 1994.
- [19] N. Saigal, S. Baboota, A. Ahuja, and J. Ali, "Fast-dissolving intra-oral drug delivery systems," *Expert Opin Ther Pat*, vol. 18, no. 7, pp. 769–781, 2008.
- [20] V. Parkash, S. Maan, Deepika, S. K. Yadav, Hemlata, and V. Jogpal, "Fast disintegrating tablets: Opportunity in drug delivery system," *J Adv Pharm Technol Res*, vol. 2, no. 4, pp. 223–235, 2011.
- [21] J. J. Schwegman, L. M. Hardwick, and M. J. Akers, "Practical formulation and process development of freeze-dried products," *Pharm Dev Technol*, vol. 10, no. 2, pp. 151–173, 2005.
- [22] J. Liu, "Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development," *Pharm Dev Technol*, vol. 11, no. 1, pp. 3–28, 2006.
- [23] L. Lafon, "Galenic form for oral administration and its method of preparation by ...," U.S. Patent 46160471986.
- [24] P. Kearney and S. K. Wong, "Method for making freeze dried drug dosage forms," U.S. Patent 56310231997.
- [25] R. Green and P. Kearney, "Process for preparing fast dispersing solid oral dosage form," U.S. Patent 59765771999.
- [26] S. Corveleyn and J. P. Remon, "Formulation and production of rapidly disintegrating tablets by lyophilisation using hydrochlorothiazide as a model drug," *Int J Pharm*, vol. 152, no. 2, pp. 215–225, 1997.
- [27] B. Bataille, K. Ligarski, N. Jacob, C. Thohas, and C. Duru, "Study of the influence of spheronization and drying conditions on the physico-mechanical properties of neutral spheroids containing Avicel PH 101 and lactose," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 19, no. 6, pp. 653–671, 1993.
- [28] D. Faroongsarng and G. E. Peck, "Surface morphology study of solid powders evaluated by particle size distribution and nitrogen adsorption," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 20, no. 15, pp. 2353–2367, 1994.
- [29] M. Riippi, J. Yliruusi, T. Niskanen, and J. Kiesvaara, "Dependence between dissolution rate and porosity of compressed erythromycin acistrate tablets," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 46, no. 2, pp. 169–175, 1998.
- [30] J. Vertommen, P. Rombaut, and R. Kinget, "Internal and external structure of pellets made in a rotary processor," *Int J Pharm*, vol. 161, no. 2, pp. 225–236, 1998.

# **DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES**

Etant données les caractéristiques particulières de la population pédiatrique, le développement et l'évaluation des médicaments destinés à l'enfant impliquent une problématique très complexe qui représente un véritable défi. Ce travail contribue aux deux axes de recherche du point de vue galénique, qui sont le masquage de goût pour une meilleure acceptabilité et la conception d'une forme pharmaceutique en vue d'améliorer la facilité d'administration et la flexibilité de dosage.

Les principaux résultats que nous avons obtenus sont récapitulés ci-dessous:

**1.** Notre objectif étant d'utiliser des excipients tolérables et sans danger à l'égard de l'enfant, le caséinate de sodium et la lécithine reconnus comme étant des substances GRAS (Generally Recognized as Safe) ont été employés dans le but du masquage de goût de façon à encapsuler le principe actif via atomisation-séchage. L'acétaminophène a été utilisé comme un principe actif modèle. Deux formulations prototypes qui contiennent différents ratios de caséinate de sodium/lécithine, soit 1:0,5 et 5:1,5, ont été pulvérisées à partir d'une dispersion aqueuse. Les produits obtenus ont été ensuite caractérisés notamment pour leur efficacité de masquage de goût; pour cela nous avons développé une méthode d'évaluation indirecte par essai de libération du principe actif au moyen d'un système à flux continu, qui s'approche des conditions *in vivo*. En effet, la sensation ou non du goût dépendrait de la quantité de principe actif libéré dans la bouche durant un court laps de temps (de l'ordre de 2 minutes). L'essai a montré que l'association du caséinate de sodium et de la lécithine diminuait le taux de libération durant les deux premières minutes comparativement au principe actif pur. Cela signifie que le goût du principe actif devrait être effectivement masqué, ce qui est en corrélation avec les résultats de l'analyse avec la langue électronique. La caractérisation de la surface des particules mettait en évidence la différence en fonction de la formulation, notamment en fonction du ratio caséinate de sodium/lécithine. En effet, un taux plus important de ces excipients (formulation 5:1,5) semblait mieux encapsuler le principe actif, se traduisant par l'absence d'acétaminophène à la surface, confirmé grâce aux analyses en XPS. La libération du principe actif était par conséquent diminuée de façon plus importante.

**2.** Le mécanisme par lequel a lieu l'encapsulation du principe actif a été proposé basé sur le phénomène de ségrégation à l'intérieur de la gouttelette lors de l'atomisation-séchage. Il a été supposé que le principe actif étant une petite molécule soluble, il aurait tendance à se concentrer au centre, alors que le caséinate de sodium et la lécithine plus « surface-actifs »

s'accumuleraient préférentiellement à la surface des particules après séchage. De cette manière, les paramètres du procédé et de la formulation, dont la température de séchage (température d'entrée), le débit du gaz de pulvérisation, la quantité du caséinate de sodium et de la lécithine dans la dispersion à pulvériser, interviendraient sur l'efficacité d'encapsulation conditionnant le taux de libération, et influeraient ainsi sur l'efficacité du masquage de goût. L'effet de ces paramètres a été évalué à l'aide d'un plan factoriel complet. Il a prouvé, dans le domaine expérimenté, l'influence significative du caséinate de sodium et de la lécithine: l'augmentation de leur quantité a conduit à diminuer le taux du principe actif libéré durant les deux premières minutes. Le plan d'expérience a également révélé l'importance de « l'interaction » entre le caséinate de sodium et la lécithine dans le sens où l'effet d'un facteur était influencé par la présence de l'autre. La méthode du simplex permettait ensuite d'obtenir la formulation optimisée, qui a efficacement encapsulé le principe actif (à 20,2%) et réduisait significativement le taux de libération durant les deux premières minutes jusqu'à 4,15%, soit 7 fois moins comparativement au principe actif initial.

**3.** Le caséinate de calcium, un autre type des caséinates commercialisés, a été testé en tant que matrice d'encapsulation associée avec la lécithine. Il en a résulté que celui-ci avait retardé la libération du principe actif de façon plus importante que le caséinate de sodium, ce qui améliorerait l'efficacité du masquage de goût. En effet, les caséinates ont été indiqués être capables de former un film similairement à des polymères. La structure du film à base du caséinate de calcium était moins flexible dû à la forte interaction entre les chaînes polypeptidiques via la liaison avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En conséquence, la réhydratation et la solubilisation du film se sont produites de façon moins facilitée pour libérer le principe actif encapsulé.

« L'interaction » entre le caséinate de calcium et la lécithine était aussi apparue importante lors de l'étude par plan d'expériences. L'hypothèse était faite que la migration préférentielle vers la surface aurait lieu par compétitivité entre le caséinate et la lécithine tous deux étant surface-actifs, et que ces derniers pourraient également interagir par complexation, celle-ci dépendant de leurs propriétés intrinsèques ainsi que de leur ratio.

**4.** Une compréhension de la « couche d'encapsulant » en termes de composition semblait utile pour pouvoir mettre en évidence la contribution de chaque composant, dont le caséinate et la lécithine, ainsi que leur mode d'interaction à l'égard de la performance du

produit final. C'est la raison pour laquelle, les deux formulations prototypes (mentionnées dans le Chapitre I) ont fait l'objet de l'essai par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS). L'avantage de celle-ci comparée aux autres techniques d'analyse de surface comme la spectroscopie des photoélectrons X (XPS) est qu'elle se base sur l'analyse des ions moléculaires et est donc plus spécifique pour caractériser les composants organiques. Au premier instant, la technique permettait de caractériser la composition de l'extrême surface des particules, qui était en concordance avec les résultats énoncés auparavant dans le Chapitre I. Néanmoins, le profilage en profondeur de la « couche d'encapsulant » n'a pas pu aboutir en raison des conditions expérimentales inadaptées.

**5.** Un médicament destiné à l'enfant nécessite une présentation galénique spécifique et adaptée aux caractéristiques de son âge, permettant la facilité d'administration et la flexibilité en termes de dosage, d'où la conception des minigranules à désintégration rapide. Pour cela, nous avons élaboré un procédé de fabrication comprenant l'extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Différents essais de caractérisation ont pu démontrer la faisabilité d'un tel procédé pour produire des minigranules de qualité satisfaisante. Notamment, le temps de désintégration mesuré par l'analyseur de texture s'est révélé très court, quelques secondes, ce qui assurerait une désintégration rapide des minigranules dès qu'ils seront mis dans la bouche. Cela était obtenu tout en maintenant des propriétés mécaniques correctes (faible friabilité). En effet, la structure interne des minigranules lyophilisés, analysée par porosimétrie au mercure et adsorption gazeuse, présentait des pores capillaires qui favorisaient la pénétration de l'eau pour se désintégrer; mais la taille des pores restait en même temps adéquate pour maintenir une résistance mécanique suffisante.

En conclusion, l'ensemble de notre travail a pu apporter et explorer de nouvelles pistes portant sur la thématique de la formulation pédiatrique. Il s'agit de l'emploi des produits dérivés du lait, tels que les caséinates, comme des excipients potentiellement tolérables et sans danger à l'égard de l'enfant. D'autre part, la conception d'une forme galénique multiparticulaire à base de minigranules à désintégration rapide est également très prometteuse.

**Perspectives de recherche**

A la vue des résultats acquis, les perspectives de recherche de ce travail pourront s'attacher aux points suivants:

- Compréhension de « l'interaction » entre le caséinate et la lécithine: tout d'abord, le profilage en profondeur par ToF-SIMS (sous des conditions expérimentales appropriées) aidera à déterminer leur distribution en fonction de la profondeur de la « couche d'encapsulant », ce qui permettra d'élucider l'hypothèse d'une adsorption compétitive de ces composants à la surface. D'autre part, l'étude approfondie sur l'interaction chimique entre eux, telle que la complexation, semblerait nécessaire.
- Evaluation *in vivo* de l'efficacité du masquage de goût.
- Elargissement de la technique du masquage de goût ainsi que la méthode de fabrication de minigranules à différents principes actifs.



## Résumé

### **DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE MEDICAMENTS A USAGE PEDIATRIQUE**

#### **Masquage de goût du principe actif et fabrication de minigranules à désintégration rapide**

Face au manque de médicaments spécifiquement conçus et mis au point pour répondre aux besoins thérapeutiques de la population pédiatrique, les autorités nationales et européennes se sont vues dans l'obligation d'établir un cadre réglementaire visant à encourager le développement de médicaments à usage pédiatrique. Un médicament destiné à l'enfant nécessite une présentation galénique spécifique et adaptée à son âge, pour permettre une administration simple et sûre. L'Académie nationale de Pharmacie a également travaillé sur le sujet et élaboré un rapport en juin 2005 avec certaines propositions notamment de favoriser les formes orales solides dispersibles ou orodispersibles. Cependant, les formes orales solides posent le problème de l'acceptabilité et de l'évaluation de la palatabilité, condition requise qui représente un véritable défi. L'objectif de ce travail était (i) de développer des techniques de masquage du goût d'un principe actif modèle, l'acétaminophène, (ii) de mettre au point des méthodes d'évaluation du masquage de goût et de caractérisation des particules obtenues et, (iii) d'élaborer un procédé de fabrication d'une forme dispersible – des minigranules à désintégration rapide. Le caséinate de sodium et la lécithine, excipients potentiellement tolérables et sans danger pour un usage pédiatrique, ont été utilisés pour encapsuler le principe actif par atomisation-séchage. Le masquage de goût a été évalué *in vitro* de façon indirecte par des études de libération du principe actif. Nous avons développé une méthode simple avec une pompe à seringue qui utilise de faibles volumes et débits de tampon et simule le flux salivaire. La méthode d'évaluation de masquage de goût développée a donné des résultats en accord avec ceux d'autres méthodes existantes comme la langue électronique. La caractérisation des particules obtenues, notamment grâce à la spectroscopie par rayons X qui permet d'obtenir une cartographie de la composition à la surface des particules enrobées, a montré une différence de composition en fonction du ratio caséinate de sodium/lécithine utilisé lors de l'atomisation-séchage. Cette différence a pu être mise en relation avec l'efficacité de masquage de goût. Une étude a ensuite été menée pour évaluer l'effet des paramètres du procédé et de la formulation sur l'efficacité de masquage de goût. Un plan factoriel complet a permis de déterminer les variables les plus importantes influant sur la quantité de principe actif libéré durant les premières minutes, soit la quantité de caséinate de sodium et de lécithine. L'optimisation par la méthode du simplex a permis d'obtenir une formulation optimisée pour laquelle la quantité libérée était 7 fois inférieure à celle du principe actif initial durant les deux premières minutes de l'essai de libération. Une autre approche visant à améliorer l'effet de masquage de goût impliquait l'utilisation de caséinate de calcium à la place de caséinate de sodium. Le caséinate de calcium a été montré capable de retarder la libération du principe actif de façon plus importante lors de son association avec de la lécithine, ce qui améliore le masquage de goût. En effet, le masquage de goût est obtenu quand sur une courte période de temps (1 à 2 minutes), soit le principe actif n'est pas détecté, soit la quantité détectée est sous le seuil de perception du patient. Une forme galénique multiparticulaire à base de minigranules à désintégration rapide a ensuite été élaborée par extrusion-sphéronisation suivie d'une lyophilisation. Les minigranules présentaient des qualités appropriées à savoir, une bonne sphéricité, une faible friabilité, la capacité d'incorporer une quantité élevée de principe actif et de plus, ces minigranules se sont désintégrées presque immédiatement en présence d'eau lors de la mesure du temps de désagrégation avec l'analyseur de texture. Ce type de minigranules promet donc une forme galénique adaptée à la population pédiatrique grâce à la facilité d'administration et la flexibilité de dosage.

**Mots clés:** Formulation pédiatrique, Masquage de goût, Forme à désintégration rapide, Atomisation-séchage, Extrusion-sphéronisation, Lyophilisation.