



Formulation et caractérisation d'une forme buccale mucoadhésive thermogélifiante pour administration de sulfate de salbutamol

Ni Zeng

► To cite this version:

Ni Zeng. Formulation et caractérisation d'une forme buccale mucoadhésive thermogélifiante pour administration de sulfate de salbutamol. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB075 . tel-01186766

HAL Id: tel-01186766

<https://theses.hal.science/tel-01186766>

Submitted on 25 Aug 2015

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

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



Université Paris Descartes
Faculté de Pharmacie de Paris
Ecole Doctorale - Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries MTCI

THESE
Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes

**Formulation et caractérisation d'une forme buccale mucoadhésive
thermogélifiante pour administration de sulfate de salbutamol**

Par Mlle Ni ZENG

Présentée et soutenue publiquement le 21/04/2015

Devant le jury composé de :

Mme Florence AGNELY	Professeur, Université Paris Sud	Rapporteur
M Sébastien LECOMMANDOUX	Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteur
M Hatem FESSI	Professeur, Université de Lyon	Examineur
M Marc MAURY	Directeur scientifique, Unither	Encadrant industriel
M Vincent BOUDY	MCU-PH, Université Paris Descartes	Co-directeur de thèse
M Gilles DUMORTIER	PH	Directeur de thèse

Collaboration CIFRE

Unité de Technologies Chimiques et Biologiques
pour la Santé (UTCBS)
CNRS UMR 8258-Inserm U 1022, Paris



Unither Pharmaceuticals
Unither Développement Bordeaux



Remerciement

J'adresse mes remerciements sincères,

Aux Pr Florence AGNELY et Pr Sébastien LECOMMANDOUX pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse.

Au Pr Hatem FESSI pour son intérêt à ce travail et pour accepter d'être un des examinateurs.

Au Dr Vincent BOUDY, qui m'a accueillie dans son service Mise au point Galénique de l'AGEPS. Il a codirigé cette thèse, je le remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagnée et soutenue pendant tout ce temps.

A l'ensemble du service de l'AGEPS, Romain DEBIN, Alexandra GAUTIER, Audrey LEFI, Amélie WOJCIKI, Benoît D'HAYER, Emilie MOINOULOGLU pour m'avoir accompagnée. C'était un grand plaisir de travailler dans une bonne ambiance pendant ces années passées. Je n'oublie pas les anciens collègues Estelle SIGWARD, Sandrine GRAFF, Emmanuelle PILTE et les étudiants qui ont participé à ce travail : Diana SOR, Nesrine KALBOUSSI et Margaux ELISSALDE.

Au Dr Gilles DUMORTIER, mon directeur de thèse, pour son encadrement, son aide précieuse et sa patience.

Au Dr Nathalie MIGNET, responsable de l'équipe Vecteurs pour l'Imagerie Moléculaire et le Ciblage Thérapeutique de l'UTCBS, pour sa présence et sa disponibilité dans ce travail. Merci pour son aide et ses précieux conseils dans les publications. Je n'oublie pas l'ensemble de l'équipe : le Dr Michel BESSODES pour m'avoir fourni de la Cyanine, le Dr Johanne SEGUIN pour m'avoir formée pour la culture cellulaire et l'utilisation de la Fluobeam®, le Dr Cyrille RICHARD et le Dr Yohann CORVIS pour leurs conseils techniques.

Au Pr Daniel SCHERMAN, directeur du laboratoire UTCBS, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa grande gentillesse et également pour ses précieux conseils dans les publications.

A Monsieur Marc MAURY, directeur scientifique de la société Unither Pharmaceuticals, pour avoir permis cette collaboration CIFRE et pour m'avoir fait confiance tout ce temps.

A tout le personnel d'Unither qui travaille à Bordeaux et à Paris, pour m'avoir accueillie chaleureusement lors de mes visites et pour avoir pensé à moi lors des fêtes de chaque fin d'année.

Aux membres de la commission de « Dissolution » de la SFSTP : Samir HADDOUCHI, Jean-Jacques HOURI, Marc FRANCOIS, Valérie LAFFINEUR, Catherine LACAZE, Marielle BERTHIER et Patrice MALARA, pour leur intérêt à ce travail et leurs conseils au sujet de la dissolution.

Aux personnes avec qui j'ai collaboré, à savoir le Dr Imane BOUCENNA du laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université Paris Diderot, Monsieur Samir HADDOUCHI de la société SPS Pharma, le Pr Patrice RAT et son étudiante Elodie OLIVIER du laboratoire Chimie et Toxicologie Analytique et Cellulaire de l'Université Paris Descartes, pour leurs aides techniques et leurs précieux conseils.

A mes parents et toute ma famille en Chine, qui me soutiennent depuis toujours.

A mes meilleurs amis à Paris, Qian et son futur mari Pierre, qui pensent toujours à moi.

A Yang, mon cher camarade, merci pour tout.

Compétences acquises pendant la thèse

Dissolution

- Appareil de dissolution USP IV (cellule à flux continu)
- Modélisation des profils de dissolution
- Commission SFSTP « Dissolution »

Connaissance et Caractérisation d'hydrogel

- Système thermosensible, mucoadhésif
- Rhéomètre, dynamomètre, DSC ...

Biologie

- Culture de cellules adhérentes
- Essais de cytotoxicité (MTT, Alamar Blue, Hoechst 33342, Rouge Neutre, Microscopie Holographique)
- Essais de perméabilité sur le système Transwell®
- Imagerie fluorescence *in vivo*, étude de pharmacocinétique chez le lapin

Communications orales et affichées

Orale :

- Development and Characterization of a thermosensitive hydrogel for buccal drug delivery: Thermal, mechanical, mucoadhesion and drug release evaluations. BIT's 4th Annual World Symposium of Drug Delivery Systems, nov 2014, Suzhou, Chine
- Dissolution et corrélation *in vitro/in vivo*, modélisation et comparaison des profils de dissolution. SFSTP, Session d'étude de commission « Dissolution », mars 2014, Paris
- Development and characterization of a thermosensitive hydrogel for buccal drug delivery, Journée de Rentrée de l'école doctorale, déc 2013, Jussieu, Paris

Poster :

- Effects of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal drug delivery: thermal, mechanical and drug release evaluations, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31 mars-3 avril 2014, Lisbon, Portugal
- Administration des médicaments par voie buccale : Formulation d'un hydrogel thermosensible, Journée de Rentrée de l'école doctorale, nov 2012, CHU Saint Antoine, Paris

Publications

- N. Zeng, G. Dumortier, M. Maury, N. Mignet, V. Boudy Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol : Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties, Int. J. Pharm (2014) 467, 70-83 (IF 3,785)
- N. Zeng, N. Mignet, G. Dumortier, E. Olivier, J. Seguin, M. Maury, D. Scherman, P. Rat, V. Boudy. Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line. *Soumis au journal Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	9
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	12
Liste des équations.....	13
 INTRODUCTION GENERALE.....	 14
1. Contexte et partenariat du projet.....	15
2. Objectifs et démarche du projet.....	17
2.1. Objectifs	17
2.1.1. Objectifs de la partie travaux antérieurs et hypothèses expérimentales	18
2.1.2. Objectifs de la partie travaux expérimentaux	19
2.2. Phases du projet.....	21
 TRAVAUX ANTERIEURS	 22
Chapitre 1 : Salbutamol et la prise en charge de l’asthme en France	23
1. Prise en charge de l’asthme : Aspect physiopathologique.....	23
2. Spécialités à base de salbutamol commercialisées en France	27
3. Aspect physicochimique du salbutamol	29
3.1. Paramètres physicochimiques	29
3.2. Solubilité et perméabilité en fonction du pH.....	30
3.3. Stabilité de la molécule	31
4. Aspect pharmacocinétique selon les voies d’administration du salbutamol.....	33
5. Conclusion du chapitre 1	36

Chapitre 2 : Administration des médicaments par la voie buccale	37
1. Généralités	37
2. Anatomie et physiologie de la muqueuse buccale	42
2.1. La muqueuse buccale et ses fonctions	42
2.2. La sécrétion salivaire	45
3. Absorption du PA à travers la muqueuse buccale	46
3.1. Influence de l'environnement physiologique	48
3.2. Influence des propriétés physicochimiques la molécule administrée	50
3.3. Influence de la formulation	50
3.3.1. Solubilisant et promoteur d'absorption	51
3.3.2. Agent mucoadhésif	53
3.3.2.1. Fondamentaux de la mucoadhésion	53
3.3.2.2. Exemples de polymères mucoadhésifs	55
3.3.2.3. Gomme xanthane et ses applications	59
3.3.3. Autres agents : Inhibiteur d'enzyme, régulateur du pH	61
4. Méthodes d'évaluation d'une formulation appliquée à la voie buccale	62
4.1. Essais de dissolution	63
4.1.1. Appareils Pharmacopée USP et leurs applications	63
4.1.2. Appareils pour étudier les formes semi-solides	69
4.1.2. Modélisation et comparaison des profils de dissolution	71
4.1.2.1. Les modèles mathématiques	71
4.1.2.2. Pertinence du choix d'un modèle mathématique	74
4.1.2.3. Comparaison des profils de dissolution	74
4.2. Etude de la mucoadhésion	78
4.2.1. Etude <i>in vitro</i>	78
4.2.1.1. Méthodes de détachement	78
4.2.1.2. Méthodes rhéologiques	80
4.2.1.3. Autres méthodes	81
4.2.2. Etude <i>in vivo</i>	82
4.3. Etude de la perméabilité transbuccale	84
4.3.1. Méthodes utilisant une muqueuse animale	84
4.3.2. Méthodes à base de culture cellulaire	85
5. Conclusion du chapitre 2	87

Chapitre 3 : Développement d'une forme originale à base d'hydrogel thermosensible.....	89
1. <i>Hydrogel et ses applications</i>	89
1.1. Généralités.....	89
1.2. Application d'hydrogel dans le système de délivrance de médicaments	91
2. <i>Hydrogels de transition de phase « Sol-Gel »</i>	93
3. <i>Poloxamère 407 et ses applications</i>	97
4. <i>Conclusion du chapitre 3</i>	100
Conclusion des travaux antérieurs	101
 TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX.....	 103
Article 1: Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: relation between micellization, gelation, mechanic and release properties	104
Article 2: Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line	139
Travaux complémentaires : <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of mucoadhesive Poloxamer hydrogel containing a cyanine fluorescent marker	165
 DISCUSSION GENERALE	 166
1. <i>Originalité et intérêt de la composition de formulation</i>	167
2. <i>Caractéristiques et intérêt du process de fabrication</i>	169
3. <i>Contribution à l'étude des propriétés thermogélifiantes des hydrogels à usage buccal</i>	170
4. <i>Contribution à l'étude des propriétés mécaniques des hydrogels à usage buccal</i>	172
5. <i>Contribution à l'étude des mécanismes de libération à partir des hydrogels à usage buccal</i>	173
6. <i>Contribution à l'étude des propriétés mucoadhésives des hydrogels à usage buccal</i>	175
7. <i>Contribution à l'étude de perméation des principes actifs à partir des hydrogels à usage buccal</i>	176
8. <i>Contribution à l'étude de la cytotoxicité des hydrogels à usage buccal</i>	176
 CONCLUSION GENERALE.....	 179
Références bibliographiques	184

Liste des abréviations

AGEPS : Agence générale des équipements et produits de santé

ATP : Adénosine triphosphate

cAMP : Adénosine monophosphate cyclique

CMC : Carboxyméthylcellulose

CP : Carbopol®

DHM : Microscopie holographique digitale

DSC : Calorimétrie différentielle à balayage

EDMA : Ethylène diméthacrylate

EMA : Agence européenne des médicaments

FDA : Food and drug administration

HEC : Hydroxyéthylcellulose

HEMA : Hydroxyéthyl méthacrylate

HLB : Balance hydrophile/lipophile

HPC : Hydroxypropylcellulose

HPMC : Hydroxypropylméthylcellulose

Ig : Immunoglobuline

MC : Méthylcellulose

MCG : Membrane coating granule

P188 : Poloxamère 188

P407 : Poloxamère 407

PA : Principe actif

PAA : Poly(acide acrylique)

PC : Polycarbophil

PEG : Polyéthylène glycol

PEO : Poly(oxyde d'éthylène)

PVA : Poly(vinyl alcool)

PVP : Polyvinylpyrrolidone

PPO : Poly(oxyde de propylène)

SS : Sulfate de salbutamol

T_g : Température de gélification

T_m : Température de micellisation

T_{sol-gel} : Température de transition sol-gel

USP : Pharmacopée américaine (United States Pharmacopeia)

Liste des figures

Figure 1 : Technologies proposées par le Groupe Unither Pharmaceuticals	16
Figure 2 : Asthme et ses causes	24
Figure 3 : Traitement médicamenteux de l'asthme	26
Figure 4 : Énantiomère R du salbutamol (en haut) et S-salbutamol (en bas)	29
Figure 5 : Schéma de la micro-ionisation du salbutamol.	30
Figure 6 : Structures du salbutamol et de ses composés après la dégradation.....	31
Figure 7 : Oxydation du salbutamol en fonction du pH	32
Figure 8 : Vitesse de dégradation du salbutamol en fonction du pH à 85°C.....	32
Figure 9 : Structure de la cavité buccale.....	43
Figure 10 : Structure de la muqueuse buccale	44
Figure 11 : Structure générale de la mucine	46
Figure 12 : Comparaison de la structure de la peau, la muqueuse buccale et la muqueuse intestinale	47
Figure 13 : Facteurs potentiels qui peuvent impacter la dynamique de perméabilité de la muqueuse buccale.....	47
Figure 14 : Les approches possibles de la délivrance du médicament via la voie buccale au regard des propriétés anatomiques des muqueuses.....	48
Figure 15 : Différentes voies potentielles de pénétration transmuqueuse	49
Figure 16 : Considération générale pour le développement d'une formulation destinée à la voie buccale.....	51
Figure 17 : Etapes de contact et de consolidation de la mucoadhésion.....	55
Figure 18 : Phénomène de diffusion dans la mucoadhésion.....	57
Figure 19 : Structure de la gomme xanthane	60
Figure 20 : Devenir d'un médicament administré par la voie transbuccale	62
Figure 21 : Evaluations générales envisagées d'un médicament administré par la voie (trans)buccale	63
Figure 22 : Appareils de dissolution USP	64
Figure 23 : Appareil de dissolution Bio-Dis.....	66
Figure 24 : Appareil USP IV	67
Figure 25 : Schéma de montage de l'appareil à flux continu, circuit fermé.....	67
Figure 26 : Schéma représentant la cellule de diffusion de Franz	69
Figure 27 : Appareil mini-palette adapté pour les formes semi-solides	70
Figure 28 : Dispositif « adaptateur pour les formes semi-solides » de l'appareil IV	70
Figure 29 : Cinétiques d'Ordre 0.....	72
Figure 30 : Modélisation selon l'équation Higuchi	72
Figure 31 : Modélisation selon l'équation d'Hixson Crowell	73

Figure 32 : Dispositif expérimental d'évaluation de la mucoadhésion par mesure de la force de détachement.....	79
Figure 33 : Schéma de montage de la méthode du cylindre rotatif.	79
Figure 34 : Schéma illustrant le montage de l'appareil utilisé par Rao et Buri.	80
Figure 35 : Principales méthodes d'évaluation de la perméabilité transbuccale	84
Figure 36 : Ensemble des publications relatives aux hydrogels entre 1995 et 2010	89
Figure 37 : Principales applications d'hydrogel dans le secteur pharmaceutique	91
Figure 38 : Eléments clés pour développer un hydrogel utilisé pour une libération contrôlée de médicament	92
Figure 39 : Avantages et enjeux des hydrogels « Sol-Gel ».....	94
Figure 40 : Les principaux stimuli extérieurs susceptibles de déclencher une transition de phase d'hydrogel.	95
Figure 41 : Exemples de blocs hydrophobes constitutifs de copolymères pour la formulation d'hydrogels thermosensibles	96
Figure 42 : Mécanisme de gélification induite par une augmentation de température.....	96
Figure 43 : Formule chimique générale des poloxamères	97
Figure 44 : Mécanisme de gélification du poloxamère 407 dans l'eau.	99
Figure 45 : Principaux critères de la formulation	167
Figure 46 : Principaux composants de la formulation thermogélifiante mucoadhésive	168
Figure 47 : Protocole de préparation des formulations à base de poloxamère	169
Figure 48 : Rappel des méthodes utilisées dans l'évaluation des propriétés thermogélifiantes	170
Figure 49 : Rappel des méthodes utilisées dans l'évaluation mécanique.	172
Figure 50 : Rappel des méthodes utilisées dans l'étude de libération.	173

Liste des tableaux

Tableau 1 : Etapes réalisées lors du projet	21
Tableau 2 : Exemples des spécialités de salbutamol commercialisées en France.....	28
Tableau 3 : Paramètres physicochimiques du sulfate de salbutamol	29
Tableau 4 : Fractions des formes du salbutamol en fonction du pH	30
Tableau 5 : Exemples des systèmes de libération du salbutamol par la voie transbuccale	35
Tableau 6 : Exemples des spécialités administrées par la voie buccale	38
Tableau 7 : Avantages et inconvénients associés à la voie (trans)buccale	42
Tableau 8 : Muqueuses de différentes régions dans la cavité buccale humaine.....	45
Tableau 9 : Environnements physiologiques de la cavité buccale humaine.....	45
Tableau 10 : Classification des polymères bioadhésifs utilisés pour la muqueuse buccale	56
Tableau 11 : Principaux polymères mucoadhésifs issus de la première génération.....	58
Tableau 12 : Appareils de dissolution inscrits à la Pharmacopée Américaine USP.....	68
Tableau 13 : Exemples de modèles mathématiques pour décrire les profils de dissolution	71
Tableau 14 : Grandeurs et paramètres des modèles indépendants	75
Tableau 15 : Méthodes d'évaluation <i>in vivo</i>	82
Tableau 16 : Comparaison de la muqueuse buccale chez différents animaux	85
Tableau 17 : Exemples des essais de cytotoxicité sur les cellules TR146	86
Tableau 18 : Caractéristiques des poloxamères les plus couramment utilisés	98
Tableau 19 : Principales étapes de formulation et caractérisation de forme thermogélifiante mucoadhésive destinée à la voie buccale - Etat d'avancement du projet.	181

Liste des équations

Équation 1 : Modèle Korsmeyer-Peppas.....	73
Équation 2 : Coefficient de détermination ajusté	74
Équation 3 : Facteur de différence f_1	76
Équation 4 : Facteur de similarité f_2	76
Équation 5 : Viscosité en présence de mucine	81

INTRODUCTION

GENERALE

1. Contexte et partenariat du projet

Cette thèse fait suite à un stage de Master 2 Pharmacotechnie (responsable à l'époque le Pr Denis Brossard), effectué en 2011 au sein du service Mise au point galénique de l'AGEPS, AP-HP. Le service est dirigé par le Dr Vincent Boudy, MCU-PH à la faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes. Un des axes de développement de cette unité porte sur des systèmes de délivrance de type sol-gel ou solution gélifiante qui permettent de maîtriser la libération et d'optimiser le passage transmembranaire et la biodisponibilité des molécules actives. Au cours de ce stage confié par le Dr Vincent Boudy, j'ai travaillé sur la formulation sol-gel d'un agent analgésique pour une application transbuccale et sur les diverses évaluations physicochimiques notamment la libération du principe actif. A la suite de ce stage, nous avons eu l'opportunité de rencontrer Monsieur Marc Maury, directeur scientifique de la société Unither Pharmaceuticals, qui a été intéressé par ce concept.

Il est apparu que cette collaboration remplissait pleinement les prérequis du dispositif des contrats CIFRE, ceux-ci mettant à profit les synergies entre partenaires industriels, hospitaliers et universitaires. Ainsi, il présente des aspects complémentaires en termes de développement et de recherche :

- **Volet innovation industrielle** en relation avec le groupe Unither (choix de la voie buccale axe de compétence du groupe et économiquement très substantielle ; choix du principe actif le salbutamol correspondant au traitement de l'asthme aigu).
- **Volet développement** avec le département Mise au point Galénique de l'AGEPS (recherche de formes adaptées à un usage hospitalier en particulier pour des populations dites à risques comme en pédiatrie ou gériatrie).
- **Volet recherche** grâce aux compétences scientifiques de l'UTCBS et à son plateau technique.

Unither Pharmaceuticals est le partenaire industriel de ce projet. Il s'agit d'un groupe pharmaceutique CDMO (Contract Development Manufacturing Organization) français, comptant 1106 salariés dans le monde, créé en 1993 par le rachat d'une usine de façonnage pharmaceutique du groupe Sanofi. Le Groupe compte un centre de Recherche & Développement, cinq sites de production, dont quatre en France (Amiens, Coutances, Gannat, Colomiers) et un aux Etats Unis (Rochester). Il est aujourd'hui le leader mondial de la fabrication de formes unidoses stériles utilisant la technologie Blow-Fill-Seal (BFS). Son siège est à Amiens, en France. Les fonctions centrales sont réunies à Paris.

La mission d'Unither est d'apporter des solutions innovantes, compétitives et durables à ses clients : les laboratoires pharmaceutiques. Pour cela, divers modes de collaboration sont proposés :

- Unither offre la possibilité de bénéficier de la mutualisation de l'ensemble de ses moyens de production.
- Les formes pharmaceutiques proposées par Unither peuvent constituer des opportunités innovantes et économiques pour reconditionner et redynamiser des produits existants.
- Unither développe en permanence des produits innovants mis à la disposition de clients possédant les ressources commerciales et assurant ainsi leur succès sous leurs propres marques.

Afin de proposer des technologies éprouvées ou de prolonger la vie des produits, de façon compétitive, Unither possède aussi une forte expérience dans la fabrication de produits présentés en sticks-packs et en comprimés effervescents ainsi que dans le développement pharmaceutique. Au sein du centre R&D, Unither développement Bordeaux, une des activités est de proposer aux patients et aux clients des solutions innovantes, c'est par exemple le cas des produits DDS (Drug Delivery System), notamment administrés par la muqueuse buccale.



- La technologie BFS (unit-dose) : formes unidoses liquides, stériles ou avec effet barrière
- la technologie Unistick, sous forme liquide
- la technologie Unistick, sous forme poudre
- la technologie « effervescent »

Les technologies Drug Delivery System (DDS) utilisent la voie d'administration transmuqueuse. Par ailleurs, les prestations de développement sont assurées au travers d'Unither Développement Bordeaux.

Figure 1 : Technologies proposées par le Groupe Unither Pharmaceuticals

Unither Pharmaceuticals possède une longue expertise des formes buccales et a par exemple développé un substitut salivaire breveté (EP2056846) le Novasial®. Novasial® possède des caractéristiques proches de la salive en termes de composition chimique et de comportement rhéologique le rendant utile chez les patients atteints de xérostomie.

Le service recherche et développement conduit actuellement des essais cliniques sur une forme buccale liquide de paracétamol mettant à profit la technologie « Buccal Trans-Mucous Route ». Ainsi, les formes buccales et la voie transmuqueuse rentrent dans les axes d'innovation thérapeutique de ce laboratoire, ce qui conduira à la mise à disposition de formes à valeur ajoutée pour les patients.

Grâce à la convention CIFRE, le travail de thèse présenté ici a été financé par Unither Pharmaceuticals. La mise à disposition d'une forme mucoadhésive destinée à un passage transbuccal correspond aux axes de recherche de ce laboratoire pour l'obtention d'une « plateforme » adaptée à la délivrance ciblée de médicaments.

2. Objectifs et démarche du projet

2.1. Objectifs

=>Objectif principal

Notre objectif principal est de rechercher et d'évaluer des formulations innovantes, bien tolérées, et aisément administrables associant des propriétés thermogélifiantes et mucoadhésives en vue d'optimiser le passage transbuccal du salbutamol.

Chacun des concepts énoncés dans l'objectif conditionne le schéma expérimental. A titre d'exemple, une préférence toute particulière est donnée à des préparations formulées avec l'utilisation de composants inscrits à la Pharmacopée européenne en vigueur afin de rendre plus rapide une potentielle mise sur le marché.

Au cours de ce travail, nos objectifs en termes de démarche originale et de recherche étaient :

- De proposer une méthodologie complète et des techniques innovantes pour la caractérisation des formulations, par exemple l'étude de modélisation de la libération du salbutamol, de cytotoxicité sur l'épithélium buccal ainsi que de l'imagerie.

- De corréler les paramètres obtenus entre eux afin de mieux comprendre les phénomènes qui sont mis en jeux.

Parallèlement, nos objectifs en termes de développement industriel et d'innovation étaient :

- D'apporter une solution innovante au laboratoire d'Unither,
- De proposer une forme adaptée aux besoins spécifiques en pédiatrie ou en gériatrie.

2.1.1. Objectifs de la partie travaux antérieurs et hypothèses expérimentales

La partie travaux antérieurs a pour objectif de préciser l'état des « connaissances » scientifiques afin de définir le contexte de notre travail avec notamment :

(i) Mise en évidence l'intérêt médical du salbutamol, de la voie buccale et des formes thermogélifiantes mucoadhésives.

(ii) Définition des axes possibles de développement et d'optimisation de ces formes qui restent d'actualités dans les domaines de la recherche académique et de l'innovation industrielle en médecine humaine.

(iii) Précision des modes de « screening » et d'évaluation classiquement décrits ou plus innovants comme l'imagerie.

Dans ce manuscrit, les travaux antérieurs sont composés de trois chapitres, qui présenteront respectivement :

- Les propriétés du salbutamol et son application dans la prise en charge de l'asthme (Chapitre 1).
- Les connaissances physiologiques et galéniques sur l'administration de médicaments par la voie buccale (Chapitre 2).
- Le développement d'une forme innovante à base d'hydrogel thermosensible (Chapitre 3).

L'hypothèse expérimentale résulte de l'analyse de la littérature et repose sur la possible synergie entre polymères thermogélifiants et mucoadhésifs, dont les principales caractéristiques sont décrites ci-dessous :

- Hydrogel thermogélifiant *in situ*, qui présente la propriété d'être à l'état liquide à température ambiante (20°C), facilitant son administration, et à l'état gel après son administration (37°C).

- Agent mucoadhésif, qui présente la propriété de mucoadhésion et permet un contact intime et prolongé entre la forme galénique et la muqueuse buccale afin d'avoir un temps de contact prolongé et ainsi espérer optimiser l'absorption.
- Additif mécanique, qui augmente la viscosité de la forme et le pouvoir de rétention du salbutamol afin de tenter de limiter les effets de la salive et des mouvements de la langue.

2.1.2. Objectifs de la partie travaux expérimentaux

Les travaux expérimentaux sont constitués de nos deux articles de recherche sur la formulation et la caractérisation de nos hydrogels *in vitro*. Ces deux articles ont été complétés par la description de travaux complémentaires qui apportent des informations pertinentes bien qu'ils ne soient pas finalisés. Ces travaux sont suivis d'une discussion générale soulignant les points forts du travail en termes d'originalité de la démarche, de contribution dans le domaine scientifique et d'innovations en vue du développement de nouvelles formulations répondant aux besoins des patients.

Divers procédés *in vitro* et *in vivo* ont été mis en œuvre pour s'assurer que les caractéristiques ou propriétés suivantes résultent bien de notre hypothèse et des formulations qui ont été réalisées :

- Optimiser la transition « Sol-Gel »
- Augmenter le temps de présence dans la cavité buccale
- Obtenir une cinétique de libération compatible avec le traitement de la pathologie
- Optimiser la tolérance locale sur le tissu épithélial
- Améliorer la perméabilité transbuccale

i) Mesurer la transition « Sol-Gel » : Notre forme doit se présenter sous forme liquide à température ambiante (autour de 20°C) et sous forme de gel après administration (37°C). En effet, la forme liquide facilite la préparation et l'administration, tandis que la forme gel va permettre une propriété mécanique et une libération prolongée du PA. Il est donc important de maîtriser le comportement de la thermogélification. Une température de gélification entre 28 et 34°C est ainsi recherchée.

ii) Évaluer la présence de la forme : Un des facteurs qui déterminent le succès d'un système transbuccal est la rétention de la forme sur le site d'application. L'utilisation de polymères mucoadhésifs est essentielle pour maintenir un contact intime et prolongé entre le

gel et la muqueuse buccale afin d'avoir une durée d'absorption plus longue. Les propriétés mécaniques mucoadhésives jouent ainsi un rôle important vis-à-vis du temps de présence du gel dans la cavité buccale.

iii) Évaluer la libération du PA : Une fois que la forme passe de l'état liquide à l'état gel dans les conditions physiologiques, la constitution d'une structure matricielle peut entraîner une cinétique de libération contrôlée. Par ailleurs, l'utilisation de polymères mucoadhésifs et d'additifs mécaniques peut renforcer la réticulation. L'effet du réseau polymérique peut être appréhendé par la cinétique de libération du PA à partir du gel.

iv) Évaluer la tolérance locale vis-à-vis du tissu épithélial : La formulation développée doit être peu irritante vis-à-vis de la muqueuse buccale. Il existe plusieurs modèles d'évaluations *in vivo*, *ex vivo* et *in vivo*.

v) Mesurer la perméabilité transbuccale : Contrairement à la muqueuse gastro-intestinale, la muqueuse buccale n'est pas un site d'absorption, il s'agit d'une barrière de protection permettant d'isoler la cavité buccale des tissus sous-jacents. Néanmoins, cette barrière n'est pas absolue et certaines régions de la cavité buccale, comme la muqueuse sublinguale, présente une perméabilité connue et exploitée depuis longtemps.

2.2. Phases du projet

Le projet de thèse s'est déroulé chronologiquement selon le Tableau 1.

Tableau 1 : Etapes réalisées lors du projet

Action	Objectifs	Détails
1. Études bibliographiques	Établir le projet avec les encadrants de thèse et planifier les actions à mener	▪ Maîtrise du contexte de l'administration des médicaments par la voie buccale ▪ Recherches sur les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques du principe actif (PA) ▪ Recherches sur les excipients, les techniques de fabrication des gels et leurs caractérisations
2. Formulation des hydrogels	Réaliser des formulations stables	Composition de formulation : ▪ Base thermogélifiante ▪ Agent mucoadhésif ▪ Épaississant ▪ Principe actif
3. Caractérisation des hydrogels	▪ Mise en œuvre des techniques de caractérisation avec les collaborateurs académique et industriel ▪ Sélectionner les formulations optimales	<i>In vitro</i> : ▪ Capacité de gélification ▪ Propriétés mécaniques ▪ Étude rhéologique ▪ Capacité de mucoadhésion ▪ Cinétique de libération ▪ Cytotoxicité et perméabilité transcellulaire <i>In vivo</i> : ▪ Imagerie fluorescence pour suivre le gel ▪ Étude pharmacocinétique
4. Interprétation des résultats	Mise en œuvre des publications	▪ Rassembler et analyser les données obtenues ▪ Corréler les résultats

TRAVAUX ANTERIEURS

Chapitre 1 : Salbutamol et la prise en charge de l'asthme en France

1. Prise en charge de l'asthme : Aspect physiopathologique

Selon le manuel Merck, l'asthme est défini comme une maladie pulmonaire caractérisée par l'obstruction réversible au passage du flux aérien, l'inflammation des voies aériennes, et l'augmentation de la réactivité des voies aériennes à une série de stimuli (http://mm.msd-france.com/manuel_merck/, 2013). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'asthme est une maladie chronique qui se caractérise par des crises récurrentes où l'on observe des difficultés respiratoires et une respiration sifflante et dont la gravité et la fréquence varient d'une personne à l'autre (<http://www.who.int/respiratory/asthma/fr/>, 2015).

D'après les estimations de l'OMS, il y a actuellement 235 millions d'asthmatiques dans le monde, dont trois millions de français. C'est la maladie chronique la plus courante chez les enfants. L'asthme est sous-diagnostiqué et insuffisamment traité. Il représente une lourde charge pour les individus et les familles et limite parfois l'activité du malade tout au long de sa vie. On peut, néanmoins, maîtriser l'asthme grâce à diverses classes de médicaments. On peut aussi en réduire la gravité en évitant ce qui le déclenche.

Généralement, l'obstruction des voies aériennes dans l'asthme est due à une association de facteurs tels qu'un spasme du muscle lisse bronchique, un œdème de la muqueuse des voies aériennes, l'augmentation des sécrétions muqueuses, une infiltration cellulaire des parois des voies aériennes, ainsi que la lésion et la desquamation de l'épithélium bronchique. Le spasme bronchique dû à la contraction de la musculature lisse est néanmoins considéré comme la principale cause de l'obstruction des voies aériennes.

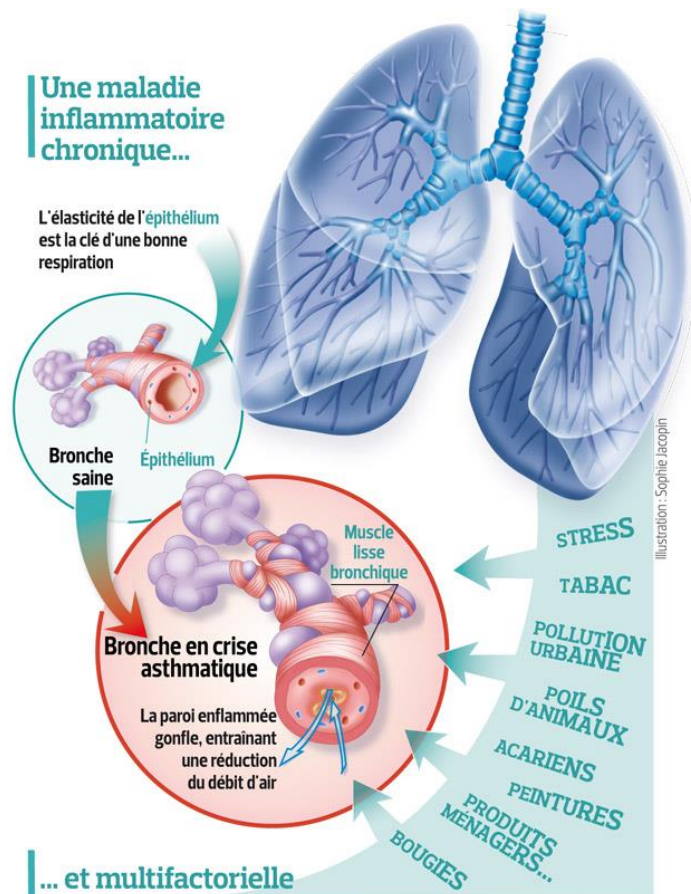


Figure 2 : Asthme et ses causes (<http://sante.lefigaro.fr/>, 2010)

Afin d'obtenir un traitement efficace de l'asthme en fonction de la gravité de l'affection, trois solutions sont proposées :

- Contrôle des facteurs environnementaux qui sont cités dans la Figure 2 pour éviter ou minimiser les symptômes ou les exacerbations,
- Utilisation de médicaments pour soulager les symptômes, faire régresser et prévenir l'inflammation des voies aériennes,
- Proposer une éducation sanitaire qui favorise la collaboration entre le patient, sa famille et les acteurs de soin.

En ce qui concerne le traitement médicamenteux, les médicaments anti-asthmatiques peuvent être divisés en deux selon le but du traitement : soit soulager les symptômes soit réduire les nombres d'épisodes voir les supprimer (i.e. traitement de fond) (http://mm.msd-france.com/manuel_merck/, 2013) (Figure 3). Ils comprennent, tout d'abord, les beta 2-agonistes et la théophylline. Celle-ci provoque la relaxation du muscle lisse bronchique probablement par inhibition de la libération intracellulaire du calcium. D'autres classes thérapeutiques peuvent être citées : Les agents anti-cholinergiques par exemple l'atropine et le

bromure d'ipratropium, les corticoïdes, le cromoglycate et le nedocromil qui peuvent inhiber la libération des médiateurs par les cellules inflammatoires, ainsi que les modificateurs des leucotriènes souvent administrés par la voie buccale. Parmi ces médicaments, les beta 2-agonistes sont les molécules les plus utilisées, car ils possèdent l'activité bronchodilatatrice la plus puissante chez l'homme (Bard et *al.*, 1999). Ils sont capables de stimuler les récepteurs beta 2-adrénergiques qui sont retrouvés dans une grande variété de cellules pulmonaires, notamment dans les cellules musculaires lisses bronchiques. Cela est responsable d'une relaxation du muscle lisse bronchique qui va soulager les symptômes de la crise de l'asthme dans le cas des molécules de courte durée d'action. Ils comprennent le salbutamol, la terbutaline, le pirbutérol, le métaprotérénol, le bitoltérol et l'isoétharine. En revanche, le salmétérol et le formotérol sont deux beta 2-agonistes à durée d'action prolongée, qui ne doivent pas être utilisés pour traiter les symptômes aigus. Ils sont par conséquent très utiles dans le contrôle de symptômes nocturnes.

Parmi ces molécules, le salbutamol a particulièrement retenu l'attention du laboratoire Unither Pharmaceuticals.

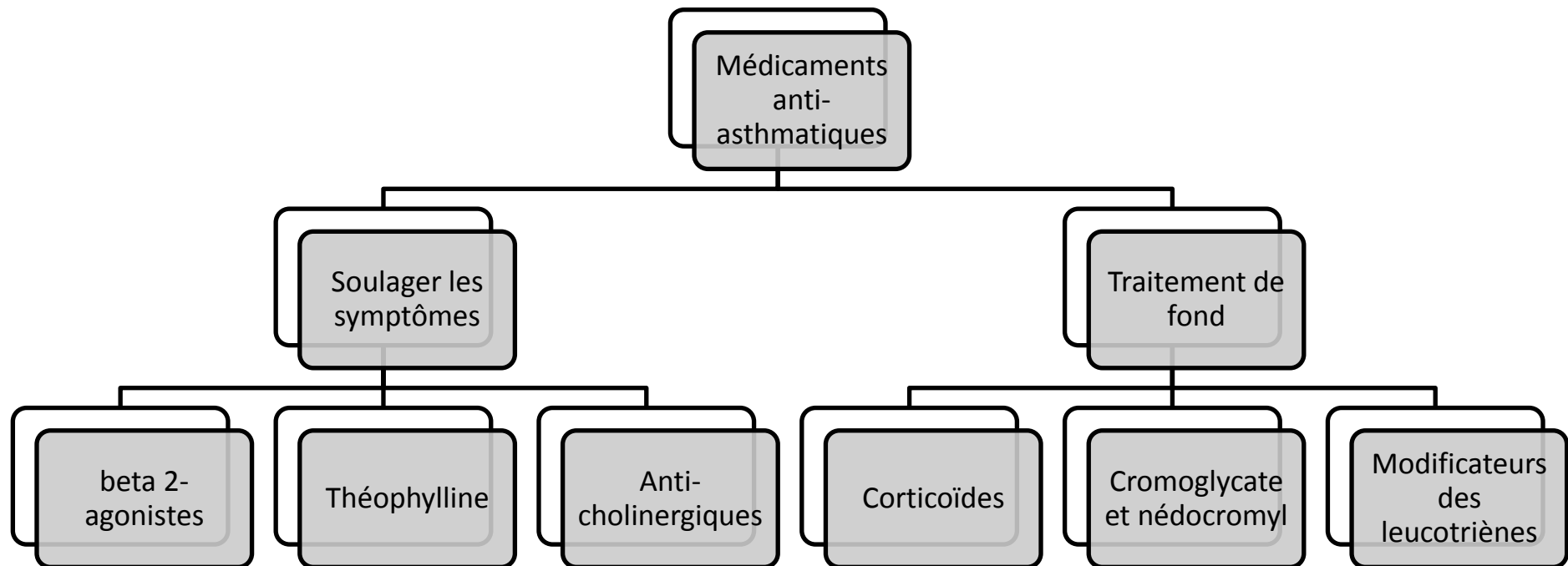


Figure 3 : Traitement médicamenteux de l'asthme (adapté de (http://mm.msd-france.com/manuel_merck/, 2013))

2. Spécialités à base de salbutamol commercialisées en France

Comme les autres médicaments bêta-agonistes, le salbutamol peut relaxer la musculature lisse bronchique et module la libération des médiateurs, au moins en partie, par stimulation du système adényl cyclase cAMP. Il protège, en outre, de l'action de divers bronchoconstricteurs, empêche les fuites liquidiennes de la microcirculation à l'intérieur des voies aériennes et augmente la clairance mucociliaire (Bard et *al.*, 1999).

Les propriétés bronchodilatatrices rapides du salbutamol sont utilisées dans le traitement des symptômes et de la crise d'asthme. Le salbutamol exerce son activité bronchodilatatrice pendant 4 à 6 heures chez la plupart des patients. Son délai d'action est très court.

Le salbutamol inhalé est le médicament de choix pour traiter la bronchoconstriction aiguë et pour prévenir le bronchospasme induit par l'exercice physique. Dans les formulations médicamenteuses, le salbutamol se présente sous forme de sulfate. Ses modes d'administration sont multiples mais la voie inhalée est à privilégier compte tenu de sa bonne efficacité et de sa tolérance. Pour obtenir un effet direct sur les muscles lisses des bronches, le salbutamol est en général administré sous forme d'un aérosol-doseur ou d'un nébuliseur. Pour la forme aérosol-doseur, une coordination main poumon est nécessaire, ce qui rend l'administration difficile chez les nourrissons, les jeunes enfants ou les personnes âgées dépendantes. Il peut également être administré par la voie orale ou en cas d'urgence par injection. En France, le salbutamol est commercialisé sous plusieurs noms déposés : Ventoline® (Princeps), Airomir®, Asmasal Clickhaler®, Salbumol® ... (<http://www.vidal.fr/>, 2015). Ils peuvent se présenter sous forme de solution, suspension, comprimé ou suppositoire (Tableau 2).

Tableau 2 : Exemples des spécialités de salbutamol commercialisées en France (<http://www.vidal.fr/>, 2015)

Spécialité	Forme	Composition	Indication
Ventoline® 100 µg	Suspension pour inhalation : flacon pressurisé de 200 doses avec valve doseuse et embout buccal	- Salbutamol 100 µg/dose (soit SS 120,5 µg/dose) - Gaz propulseur : norflurane (tétrafluoroéthane ou HFA 134a)	Traitement symptomatique de la crise d'asthme
Ventoline® solution pour inhalation par nébuliseur	Solution pour inhalation par nébuliseur à 1,25 mg ou 2,5 mg ou 5 mg/2,5 ml	- Salbutamol 1,25 ou 2,5 ou 5 mg/dose (soit SS 1,5, 3, ou 6 mg/dose) - NaCl, H ₂ SO ₄ dilué, eau ppi	Traitement symptomatique des asthmes aigus graves
Ventoline® 0,5 mg/1 ml solution injectable	Solution injectable sous -cutanée	- Salbutamol 0,5 mg/amp (soit SS 0,6 mg/amp) - NaCl, H ₂ SO ₄ qsp pH 3,5, eau ppi - Gaz d'inertage : azote	Traitement symptomatique de l'asthme aigu de l'adulte
Salbumol® comprimé	Comprimé à 2 mg	- Salbutamol 2 mg/cp (soit SS 2,4 mg/cp) - Lactose monohydraté, amidon de maïs, amidon pré-gélatinisé, stéarate de Mg	Traitement des menaces d'accouchement prématuré
Salbumol® suppositoire	Suppositoire à 1 mg	- Salbutamol 1 mg/suppos - Glycérides hémi-synthétiques solides (type Witepsol H15)	Traitement des menaces d'accouchement prématuré

3. Aspect physicochimique du salbutamol

3.1. Paramètres physicochimiques

Dans la monographie de la Pharmacopée Européenne et le Manuel Merck, les propriétés physicochimiques du salbutamol sous forme de sulfate sont décrites et résumées dans le Tableau 3. Les structures chimiques de la molécule sont montrées dans la Figure 4.

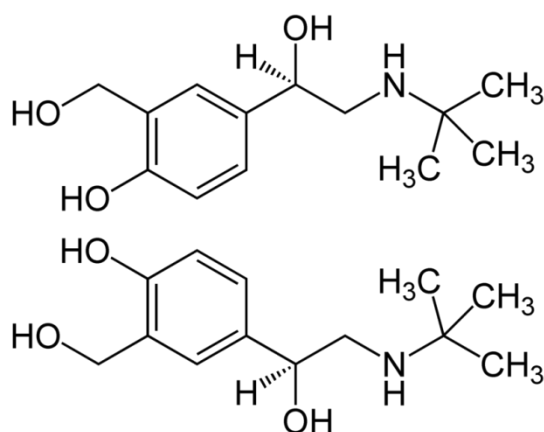


Figure 4 : Énantionère R du salbutamol (en haut) et S-salbutamol (en bas)
(<http://fr.wikipedia.org/>, 2014)

Tableau 3 : Paramètres physicochimiques du sulfate de salbutamol

Paramètre	
Nom propre :	sulfate de salbutamol
Nom chimique	Bis[1RS)-2-[(1,1-diméthylethyl)amino]-1-[4-hydroxy-3-(hydroxyméthyl)phényl]éthanol] sulfate
Formule moléculaire et masse moléculaire	[C ₁₃ H ₂₁ NO ₃] ₂ H ₂ SO ₄ (576,7)
Solubilité	Il est soluble dans 4 parties d'eau (1 g dans 4 mL d'eau)
Valeur du pH	4,3
Valeurs du pKa	9,2 et 10,2
Coefficient de distribution	Le coefficient de distribution du salbutamol entre l'octanol et l'eau, déterminé par HPLC, répond à l'équation log D = -0,5, à un pH de 7,42 et à la température ambiante

3.2. Solubilité et perméabilité en fonction du pH

Le salbutamol est une molécule amphotère qui possède deux pKa : 9,2 et 10,2. Son schéma d'ionisation est montré dans la Figure 5.

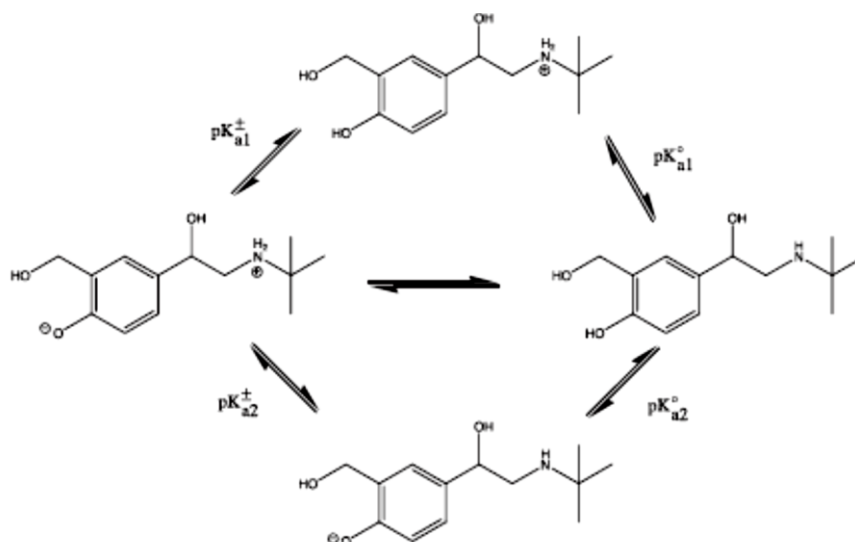


Figure 5 : Schéma de la micro-ionisation du salbutamol. $pK_{a1} = 9,22$, $pK_{a2} = 10,22$
(Ijzerman et al., 1984)

Suite à sa structure chimique, il existe quatre formes : protonée F^+ , neutre F^0 , zwitterionique $F^\pm$, et déprotonée F^- . Entre pH 6,0 et 8,5 les quatre formes peuvent coexister (Dodson et al., 2011). En fonction du pH, leurs proportions varient comme cela est mentionné dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Fractions des formes du salbutamol en fonction du pH (Imboden et Imanidis, 1999)

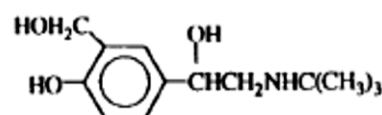
pH	F^+	$F^\pm$	F^0	F^-
3	0.999	6.03×10^{-7}	2.51×10^{-7}	3.63×10^{-14}
7.4	0.979	0.0148	0.00615	2.24×10^{-5}
9.5	0.246	0.469	0.195	0.0894
12	2.69×10^{-5}	0.0162	0.00676	0.977

Dans le travail d'Imboden et Imanidis, la solubilité et la perméabilité du salbutamol à travers une membrane de polypropylène ont été évaluées (Imboden et Imanidis, 1999). La solubilité du salbutamol diminue lorsque la valeur du pH augmente. Ainsi à pH 3, le salbutamol présente une meilleure solubilité à 263,5 mg/ml. En revanche, l'abaissement du

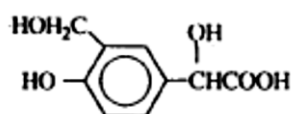
pH favorisant l'ionisation sous forme protonée pourrait être associé à une moindre perméabilité du salbutamol.

3.3. Stabilité de la molécule

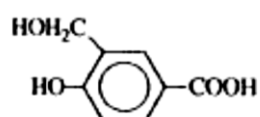
Il est démontré que le salbutamol se décompose dans les solutions aqueuses à température élevée (étude réalisée entre 55 et 85°C) (Hakes *et al.*, 1979; Mälkki-Laine et Tammilehto, 1990). Généralement, quatre produits de dégradation ont été identifiés (Mälkki-Laine et Hartikainen, 1996) (Figure 6). Les composés 1 et 2 sont des acides phénoliques. La formation de ces composés est pH-dépendante. Dans les acides forts, le composé 1 est le principal produit. Quand le pH augmente, la formation du composé 2 devient prédominante (Figure 7).



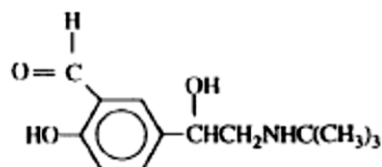
salbutamol



α ,4-dihydroxy-3-hydroxymethylbenzene acetic acid (I)



4-hydroxy-3-hydroxymethylbenzoic acid (II)



2-hydroxy-5-(2-tert-butylamino-1-hydroxyethyl)benzaldehyde (IV)

Figure 6 : Structures du salbutamol et de ses composés après la dégradation (Mälkki-Laine et Hartikainen, 1996)

Plusieurs travaux de recherche ont montré que la dégradation du salbutamol dépend du pH (Mälkki-Laine et *al.*, 1995; Mälkki-Laine et Hartikainen, 1996; Mälkki-Laine et Tammilehto, 1990). Sa vitesse de décomposition augmente avec le pH (Figure 8). Dans ces articles, il est indiqué que le salbutamol est plus stable au pH 3,5 (Mälkki-Laine et Tammilehto, 1990). Dans la monographie des produits de GSK (GlaxoSmithKline), le pH de la solution de Ventoline® pour générateur d'aérosol est ajusté à 3,5 à 4,5 (ou à 3,4 à 4,4) avec l'acide sulfurique dilué (GlaxoSmithKline Inc., 2007). Quant à la solution injectable, le pH est ajusté à 3,5 avec l'acide sulfurique (GlaxoSmithKline Inc., 2011).

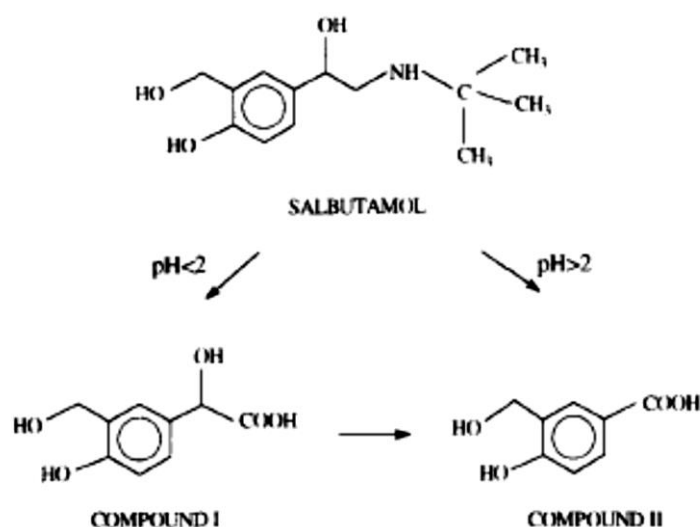


Figure 7 : Oxydation du salbutamol en fonction du pH (Mälkki-Laine et *al.*, 1995)

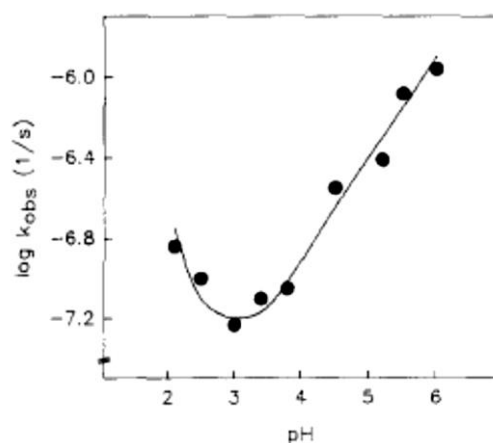


Figure 8 : Vitesse de dégradation du salbutamol en fonction du pH à 85°C (Mälkki-Laine et *al.*, 1995)

Des antioxydants ont été utilisés pour tenter de stabiliser la solution de salbutamol, tels que la cystéine, l'acide ascorbique, le métabisulfite et le bisulfite de sodium (Mälkki-Laine et al., 1995). En revanche, l'acide ascorbique n'a pas un effet significatif car il se dégrade dans la solution à température élevée. L'effet de la concentration d'antioxydant a aussi été évalué. Trois concentrations de bisulfite de sodium ont été testées : 0,05%, 0,1%, 0,5%. La concentration de 0,05% s'est révélée trop faible pour stabiliser la solution alors qu'en revanche à 0,5% un effet paradoxal est apparu avec une accélération de la dégradation du principe actif.

L'utilisation des rayons gamma dans la stérilisation des médicaments s'est beaucoup développée ces dernières années. La dégradation du salbutamol à l'état solide et dans la solution après la radiation gamma a été étudiée. Les résultats d'HPLC ont montré que l'irradiation ne pouvait correspondre à une méthode de choix car celle-ci aboutissait à une perte significative de la proportion de la molécules non-dégradée avec la forme solide et encore plus importante avec la solution (Basly et Duroux, 1997).

4. Aspect pharmacocinétique selon les voies d'administration du salbutamol

La voie inhalée permet d'obtenir un effet clinique rapide (en quelques minutes) se maintenant pendant plusieurs heures après la fin de l'administration. Après inhalation des doses de salbutamol recommandées, les concentrations plasmatiques du médicament sont très faibles.

La diffusion de salbutamol au travers de la membrane alvéolo-capillaire est lente et le passage systémique persiste après la fin de la nébulisation. Après nébulisation du salbutamol pendant 10 à 15 minutes, les taux plasmatiques augmentent régulièrement à partir de la 15^{ème} minute pour atteindre une valeur maximale à la 45^{ème} minute puis un plateau se maintient à un niveau légèrement inférieur pendant près de 2 heures (Janson, 1991).

Une proportion d'environ 10% de la dose de salbutamol inhalée se trouve dans les poumons. Environ 85% du salbutamol administré par aérosol-doseur ou nébuliseur est déglutie vers le tractus digestif. Cependant, en raison des faibles posologies administrées (de 100 à 200 µg), les quantités totales avalées restent négligeable pour introduire un quelconque effet (GlaxoSmithKline Inc., 2007). La fraction déposée au niveau des voies respiratoires est absorbée dans le tissu pulmonaire et la circulation, mais elle n'est pas métabolisée au niveau des poumons. Une fois arrivée au niveau de la circulation systémique, elle subit un métabolisme hépatique puis est excrétée, principalement dans l'urine.

Les voies injectables (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire) sont utilisées en cas d'impossibilité ou d'échec de la voie inhalée. L'administration intraveineuse directe du salbutamol provoque un pic plasmatique immédiat (~ 10 min) suivi d'une baisse progressive (Janson, 1991). La demi-vie plasmatique après administration intraveineuse à des volontaires sains est d'environ 4 heures et la liaison aux protéines sériques (à 50 ng/ml) est de 8% (GlaxoSmithKline Inc., 2011). La biodisponibilité après injection intramusculaire et sous-cutanée est identique à celle obtenue lors de l'administration intraveineuse. Approximativement 74% de la dose injectée est excrétée dans les urines de 24 heures, en partie sous forme inchangée (63%), en partie sous forme de métabolite (11%) (GlaxoSmithKline Inc., 2011).

L'absorption du salbutamol par la muqueuse gastro-intestinale et la muqueuse rectale est bonne (supérieure ou égale à 90%). Il est considéré comme une molécule de classe 1 dans le système de classification biopharmaceutique (BCS). Néanmoins, par voie orale, le salbutamol subit une métabolisation présystémique importante notamment par un premier passage digestif ainsi qu'un premier passage hépatique, avec transformation en sulfate phénolique (Morgan et *al.*, 1986). Le pic plasmatique se situe entre la 1^{re} et la 3^e heure après l'administration. La demi-vie varie de 3 à 5 heures.

Le comportement pharmacocinétique du salbutamol par voie orale (inactivation partielle dans le tractus gastro-intestinal, effet de premier passage hépatique, courte durée d'action ...) a amené certaines équipes à entrevoir la voie transbuccale comme une alternative envisageable. Celle-ci combine la facilité de l'administration de la voie orale avec certaines caractéristiques anatomiques plus favorables pour optimiser l'absorption du principe actif. Il s'agit principalement de film (Singh et *al.*, 2010), et de patch (Patel et Poddar, 2009; Ayrivan Puratchikody et *al.*, 2011; Vasantha et *al.*, 2011) (Tableau 5).

Des études *in vitro* montrent que ces formes buccales présentent une bonne stabilité et un profil de libération intéressant. Dans le travail de Puratchikody et *al.*, l'étude de stabilité a été réalisée en conservant les patchs à $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et $75 \pm 5\%$ RH pendant 6 mois. La teneur du salbutamol dans les patchs n'a pas montré de dégradation significative (Ayrivan Puratchikody et *al.*, 2011).

Dans le travail de Singh et *al.*, l'efficacité *in vivo* des films bioadhésifs du salbutamol a été évaluée. Un bronchospasme a été induit par l'histamine sur les cobayes, puis le monitoring de fréquences respiratoires a été utilisé comme critère principal d'efficacité. Les films ont conduit à une réduction prolongée de la fréquence respiratoire (de 1,5 à 4h) versus la solution de salbutamol (1h) (Singh et *al.*, 2010).

Tableau 5 : Exemples des systèmes de libération du salbutamol par la voie transbuccale

Forme	Composition	Caractérisation	Référence
Film	Salbutamol sulfate 4,2 mg/cm ² , NaCMC (sodium carboxyméthylcellulose), Carbopol 940P, PEG 400	- Epaisseur, uniformité de masse et teneur du PA ; - pH de surface ; - Gonflement ; - Propriétés mécaniques et mucoadhésives ; - Libération <i>in vitro</i> ; - Efficacité <i>in vivo</i>.	(Singh et <i>al.</i> , 2010)
Patch	Salbutamol sulfate 1,6 mg/cm ² , PVA, PVP K30, Chitosan, PEG 400	- Epaisseur, pH de surface ; - Gonflement ; - Temps de résidence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ; - Mucoadhésion ; - Libération <i>in vitro</i> ; - Stabilité.	(Puratchikody et <i>al.</i> , 2011)
Patch	Salbutamol sulfate 10 mg/2 cm ² , HPMC K4M, PVA, Carbopol 934p, NaCMC, PVP K30, PEG 400	- Uniformité de masse, d'épaisseur et de teneur du PA ; - pH de surface ; - Gonflement ; - Mucoadhésion ; - Dissolution <i>in vitro</i> ; - Pénétration <i>in vitro</i> ; - Stabilité accélérée ; - Stabilité dans la salive.	(Puratchikody et <i>al.</i> , 2011)

Ces premières études montrent clairement que le salbutamol est un candidat intéressant pour développer des systèmes à libération contrôlée par voie buccale. Comme la biodisponibilité escomptée par la voie transbuccale pourrait être proche de la voie injectable, une quantité de 0,5 mg/dose a été sélectionnée dans notre travail au regard de la spécialité Ventoline® solution injectable.

5. Conclusion du chapitre 1

La voie pulmonaire, la plus utilisée dans la prise en charge de l'asthme, fait appel aux formes inhalées qui présentent une variabilité de biodisponibilité. La voie injectable, seule alternative en cas d'urgence où la voie inhalée n'est pas utilisable, reste néanmoins une voie invasive voire douloureuse. La forme buccale, présentée dans ce travail, est une réelle alternative thérapeutique. Pour cela, la dose administrée et la biodisponibilité doivent être maîtrisées. Les chapitres 2 et 3, dédiés respectivement aux particularités de la voie buccale et à la forme d'hydrogel vont nous permettre de définir les points critiques relatifs à ce mode d'administration.

Chapitre 2 : Administration des médicaments par la voie buccale

1. Généralités

En général, les voies d'administration d'un médicament peuvent varier en fonction de la pathologie à traiter (traitement systémique ou local), des propriétés biopharmaceutiques et de la stabilité du médicament, et aussi de l'état du patient (état de conscience ou psychologique, troubles fonctionnels, accessibilité des voies d'administration). La voie orale est la plus fréquemment utilisée. Cette administration par la bouche, suivie par le passage au travers du tube digestif et absorption du médicament, est facile, économique et aisément répétable. Néanmoins, par cette voie, certains médicaments peuvent être inactivés dans le tractus gastro-intestinal, ou métabolisés par l'effet de premier passage hépatique. En outre, en cas d'urgence, la voie orale est moins efficace et parfois inaccessible. La voie parentérale avec utilisation d'aiguille permet d'atteindre un effet thérapeutique rapide, mais cette voie invasive et douloureuse peut être associée à des problèmes d'irritations, voire d'infections.

Ces inconvénients ont incité certains investigateurs à considérer la voie muqueuse comme « voie parentérale sans aiguille » et à la proposer comme plateforme d'absorption intéressante pour une action générale ou locale.

Les muqueuses buccale, nasale, oculaire, pulmonaire, rectale et vaginale, ont fourni des opportunités excellentes à l'absorption des principes actifs. L'absorption par la cavité buccale présente des avantages distincts : vascularisation très développée, excellente accessibilité, sécurité d'emploi.... Avec cette voie d'administration non invasive dont l'efficacité pourrait être comparable à celle de l'injection intraveineuse, les petites molécules ou les substances lipophiles peuvent être rapidement absorbées via la muqueuse buccale dont la membrane épithéliale est lipophile. La muqueuse buccale, très vascularisée, permet un accès rapide à l'ensemble de l'organisme, via les veines sublinguales et jugulaires. Elle est associée à une distribution directe vers le cœur, puis à la totalité de l'organisme via le système artériel.

Tableau 6 : Exemples des spécialités administrées par la voie buccale (<http://www.vidal.fr/>, 2015)

Spécialité	Laboratoire	Principe actif (s)	Indications	Propriétés
<i>Comprimés au vue d'une action systémique</i>				
Actiq® comprimé avec applicateur buccal	Cephalon (TEVA)	Fentanyl citrate	Traitement des accès douloureux paroxystiques chez des patients recevant déjà un traitement de fond morphinique pour des douleurs chroniques d'origine cancéreuse	Matrice de poudre comprimée, blanche à blanc cassé, fixée à l'aide de colle alimentaire à un applicateur en plastique radio-opaque incassable sur lequel est inscrit le dosage.
Effentora® comprimé gingival	Cephalon (TEVA)	Fentanyl citrate	Traitement des accès douloureux paroxystiques chez des patients recevant déjà un traitement de fond morphinique pour des douleurs chroniques d'origine cancéreuse	Comprimé gingival effervescent à dissolution rapide permettant la diffusion de fentanyl par voie orotransmuqueuse
Niquitin® comprimé à sucer	GlaxoSmithKline	Nicotine résinate	Traitement de la dépendance tabagique	Comprimé à sucer sans sucre
Nicotinell® gomme à mâcher	Novartis	Nicotine polacriline	Traitement de la dépendance tabagique	Gomme à mâcher médicamenteuse sans sucre
Subutex® comprimé sublingual	RB Pharmaceuticals	Buprénorphine chlorhydrate	Traitement substitutif des pharmacodépendances majeures aux opiacés	Par voie sublinguale, la biodisponibilité absolue de la buprénorphine a été

				estimée entre 15 et 30%
Films et Spray				
Breakyl® film orodispersible	MEDA Pharma	Fentanyl citrate	Traitement des accès douloureux paroxystiques pour des douleurs chroniques d'origine cancéreuse	Film bioérodable et mucoadhésif, conçu pour permettre un passage direct de fentanyl dans la circulation sanguine
Natispray® solution pour pulvérisation buccale	Teopharma	Trinitine solution alcoolique	Traitement curatif ou préventif à très court terme (ou précritique) de la crise d'angor	La pulvérisation sublinguale de Natispray® assure une absorption instantanée de la trinitrine
A action locale type bains de bouche ou autres				
Hextril® bain bouche	Johnson & Johnson	Hexétidine	Traitement local d'appoint des affections de la cavité buccale	Antiseptique à usage local
Bétadine® bain bouche	MEDA Pharma	Povidone iodée	Traitement local d'appoint des infections de la cavité buccale	Antiseptique à usage local
Pansoral® gel buccal	Pierre Fabre Médicament	Choline salicylate et Cétalkonium chlorure	Traitement d'appoint de courte durée des douleurs liées aux états inflammatoires et ulcéreux de la muqueuse buccale	Le salicylate de choline est très hydrosoluble, rapidement résorbé par la muqueuse ; Le chlorure de cétalkonium inhibe la croissance des bactéries

Hextril® gel gingival	Johnson & Johnson	Hexétidine	Soin des gencives sensibles ou saignant facilement et soin des lésions peu importantes de la muqueuse buccale	Antiseptique à usage local
Aequasyl® spray buccal	Laboratoire EISAI	Triesters de glycérol oxydés (TGO)	Traitement symptomatique des hyposialies ou asialies iatrogènes	Gel fluide huileux, lubrifiant et adhésif avec constitution d'un film lipidique dont le rôle est de limiter la perte en eau et de restaurer la viscoélasticité de la muqueuse buccale ; protecteur contre les agressions locales

L'administration des médicaments par la voie buccale est bien établie depuis plus d'un siècle. Des exemples de spécialités commercialisées en France sont cités dans le Tableau 6. La nitroglycérine et ses dérivés placés sous la langue pour une action immédiate sont largement utilisés dans le traitement de la crise d'angor. D'autres exemples comme la nicotine ou la buprénorphine comme traitement de substitution, et certains analgésiques d'action rapide (e.g. fentanyl) sont également bien connus des acteurs de santé.

Une des activités de la société Unither Pharmaceuticals consiste à faire bénéficier aux patients et à ses partenaires industriels des innovations issues de nouvelles technologies et de la recherche. Le leader mondial de la formulation et du conditionnement en unidose stérile développe aujourd'hui des solutions nouvelles. C'est par exemple le cas d'Uniflash®, marque enregistrée de la technologie BTR (Buccal Trans-Mucous Route). Le Paracétamol solution buccale breveté par Philippe Perovitch et Marc Maury (EP2101730 / US8722744 / CN101631534...) est actuellement en développement clinique. Les premiers résultats chez des patients sains et chez des patients souffrant de douleurs modérées montrent que 125 mg de paracétamol administré par la voie buccale débute son effet antinociceptif 15 minutes après l'administration, ce qui est plus rapide que la voie intraveineuse et a un effet sur la douleur équivalent à 1000 mg par voie intraveineuse (Pickering et *al.*, 2014).

Néanmoins, l'administration des médicaments par la voie buccale présente des limites. Les points forts et les points faibles associés à la voie buccale sont résumés dans le Tableau 7. En fonction de ces inconvénients, plusieurs stratégies sont proposées afin d'atteindre une activité thérapeutique optimale comme :

- Le temps de contact entre la forme médicamenteuse et la muqueuse doit être suffisant pour obtenir une absorption complète du PA. Tout drainage vers le tube digestif est à éviter, sinon la voie buccale perd de son intérêt ;
- La surface d'absorption peut être augmentée selon la forme développée ;
- Les produits irritants doivent être évités afin de ne pas léser la muqueuse, et ce surtout dans le cas d'un produit nécessitant une administration répétée.

Afin de développer une formulation destinée à la voie buccale, une connaissance préalable de la physiologie de l'environnement buccal et de sa muqueuse est nécessaire.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients associés à la voie (trans)buccale (source modifiée (Hearnden et *al.*, 2012))

Avantages	Inconvénients
• Accessibilité, possibilité d'une prise de médicament par le patient lui-même • Amélioration de la compliance du patient par rapport à la voie injectable et à la voie pulmonaire ou orale • Une action relativement rapide, surtout en cas d'urgence, e.g. asthme • Contournement du premier effet hépatique et de la dégradation du PA dans le tractus gastro-intestinal • Vascularisation importante • Possibilité de retrait rapide en cas de forme à libération prolongée	• Faible temps de résidence de la forme à cause de la vidange salivaire et de la nettoyage par la langue • Faible surface d'absorption • Absorption diminuée en cas de tabagisme • Absorption modifiée par la mastication des aliments

2. Anatomie et physiologie de la muqueuse buccale

2.1. La muqueuse buccale et ses fonctions

La cavité buccale débute à la jonction entre la peau et les lèvres (vermillon) (Figure 9). Le plafond de la bouche est formé du palais dur. La cavité buccale mène à l'oropharynx, qui comprend le palais mou, l'arrière de la langue et les amygdales. La surface interne des joues forme les côtés de la cavité buccale. La partie inférieure de la cavité buccale est le plancher de la bouche, sur lequel s'appuie la langue. Toute la cavité buccale est tapissée d'une muqueuse. Elle est mouillée par la salive produite en permanence par les glandes salivaires. La muqueuse buccale contient des récepteurs sensoriels qui réagissent à la température et au toucher ainsi que les récepteurs du goût qui se trouvent dans la muqueuse de langue (Cours Paris 5, 2014).

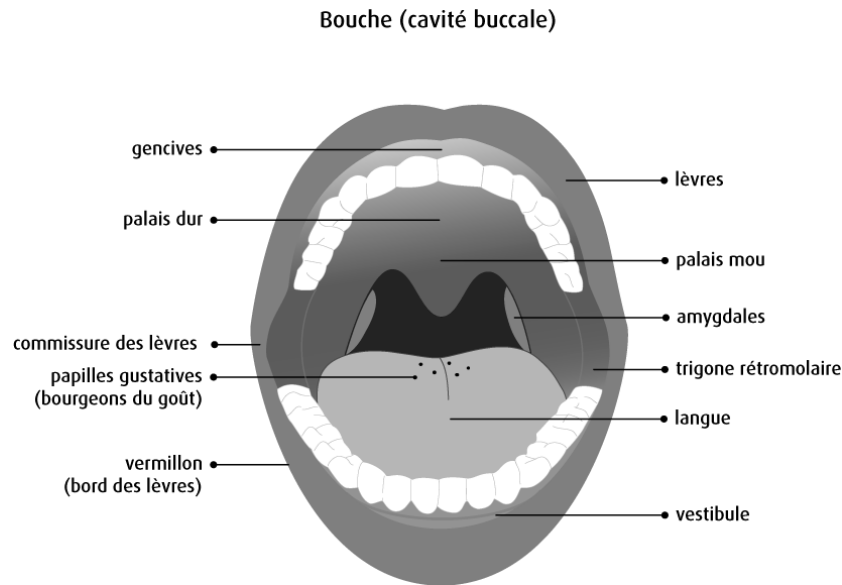


Figure 9 : Structure de la cavité buccale (source (“Anatomie et physiologie de la cavité buccale,” 2014))

D'un point de vue physiologique, contrairement à la muqueuse gastro-intestinale, la muqueuse buccale n'est pas un site d'absorption mais plutôt une barrière de protection isolant la cavité buccale des tissus sous-jacents. Généralement, elle présente la fonction de protection contre les forces mécaniques mises en jeu lors de la préhension des aliments et de leur mastication, ainsi qu'envers les micro-organismes saprophytes présents dans la cavité buccale. Cette flore est principalement constituée par des microorganismes capables d'adhérer à la muqueuse dont certains *streptococcus* (type *mitis*, *sanguinis*, *mutans* ou *salivarius*). La fonction de protection est assurée par le système immunitaire local (organes lymphoïdes, lymphocytes et plasmocytes) et par les sécrétions salivaires, qui sont constituées d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) et de facteurs bactériostatiques (lysozyme, lactoferrine). Bien que la muqueuse buccale soit protégée par son système immunitaire et par un turn-over salivaire important, celle-ci reste fragile. Toute agression, qu'elle soit biologique, physique ou chimique, pourra entraîner une modification de sa structure et donc de son intégrité.

Dans la cavité buccale, trois types de muqueuses peuvent être distinguées : la muqueuse bordante, la muqueuse masticatoire et la muqueuse spécialisée. La muqueuse s'adapte par des modifications régionales de structures : épithélium plus ou moins épais, kératinisé ou non, chorion plus ou moins dense, présence ou absence d'une sous muqueuse.

- La muqueuse bordante représente la plus large partie de la muqueuse buccale. Elle revêt le versant muqueux des lèvres, des joues, du plancher, de la face ventrale de la langue ainsi que du palais mou. Sa texture est souple et lâche car l'épithélium n'est pas kératinisé. Son chorion très vascularisé est lié à une structure sous-muqueuse d'une texture lâche.
- La muqueuse masticatrice tapisse les gencives et le palais dur. Elle aide à la compression mécanique des aliments. Contrairement à la muqueuse bordante, elle est kératinisée en surface et sans interposition de sous-muqueuse.
- La muqueuse spécialisée se situe au dos de la langue et est kératinisée comme les muqueuses masticatrices. De nombreuses papilles interviennent dans la fonction gustative.

Généralement, la muqueuse buccale en tant que site d'absorption en pharmacie galénique correspond à la muqueuse bordante, plus précisément la muqueuse des joues ainsi que celle sous la langue. En théorie, elles sont différentes mais en pratique la distinction est impossible à faire. La muqueuse buccale est constituée d'un épithélium malpighien peu ou non kératinisé suivant sa localisation et d'un tissu conjonctif dénommé lamina propria ou chorion (Figure 10). Entre tissus épithélial et conjonctif, se situe la membrane basale, mesurant 1 à 2 μm d'épaisseur. Chez l'homme (Tableau 8), l'épithélium de la muqueuse buccale (jugale) a une épaisseur de 500-600 μm , qui est constituée de 40-50 couches de cellules (Gandhi et Robinson, 1994; Harris et Robinson, 1992).

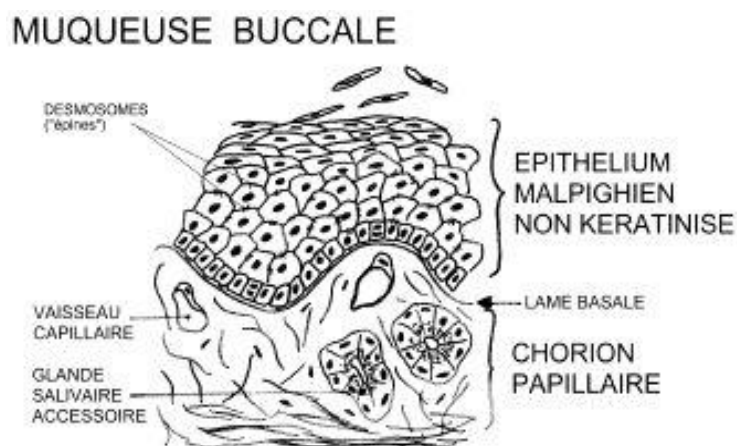


Figure 10 : Structure de la muqueuse buccale

Tableau 8 : Muqueuses de différentes régions dans la cavité buccale humaine (Paderni et *al.*, 2012)

Tissus	Structure	Epaisseur épithéliale (µm)
Buccal (jugal)	Non kératinisée	500 - 600
Sublingual	Non kératinisée	100 - 200
Gingival	Kératinisée	200
Palatal	Kératinisée	250

2.2. La sécrétion salivaire

A la surface de la muqueuse buccale, il y a un film salivaire légèrement visqueux. Les glandes salivaires accessoires sont les seules annexes de la muqueuse buccale. Il y a trois paires de glandes principales (parotides, sous-maxillaires, sublinguales), qui sont responsables de près de 95% de la sécrétion salivaire, et de nombreuses petites glandes. Grâce à la sécrétion salivaire permanente, l'humidification et l'hygiène de la cavité buccale sont assurées. La sécrétion salivaire est généralement contrôlée par le système nerveux, les deux systèmes sympathique et parasympathique interviennent. Les centres de la salivation reçoivent des informations qui entraînent soit une inhibition de la sécrétion (émotions violentes, stress...), soit une stimulation (goût, vision...). Trois facteurs principaux peuvent impacter la sécrétion salivaire : mécanique (mouvement de mastication), gustatif (avec l'acide le plus stimulant, le sucre le moins) et aussi olfactif (Humphrey et Williamson, 2001). Il peut y avoir aussi des facteurs psychique et pathologique.

Concernant ses caractéristiques physico-chimiques (Tableau 9), la salive est un liquide incolore et visqueux. Le volume excrété quotidiennement est de 0,5 à 2,0 L et sa valeur de pH peut osciller entre 5,3 et 7,8 (Humphrey et Williamson, 2001; Salamat-Miller et *al.*, 2005). Elle contient 95-99% d'eau et des composants macromoléculaires (1-5%) responsables des propriétés viscoélastiques, qui forment le mucus ("Cours Médecine, Ostéopathie - Physiologie - - Partie 2," 2010).

Tableau 9 : Environnements physiologiques de la cavité buccale humaine (Inoue et *al.*, 2008)

Paramètres	Valeur
Composants principaux	Salive, mucus
pH de la salive	5,3 – 7,8
Volume de la salive (en permanence)	696 ± 312 µL
Viscosité de la salive (mPa.s) (n = 40)	1,09 ± 0,11
Protéine dans la salive (mg/ml) (n = 40)	0,70 ± 0,30
Amylase dans la salive (IU/ml) (n = 40)	325 ± 199

Le mucus est un gel très hydraté, mais fortement adhésif, qui a pour rôle principal la protection de la muqueuse buccale. Les principaux composants du mucus sont des complexes de protéines et de glucides dont l'épaisseur varie de 40 à 300 μm (Forte et Schultz, 1989). Il s'agit de glycoprotéines de poids moléculaire variable, connues sous le nom de mucine. Les molécules, composées de monomères de glycoprotéines hautement glycosylées, sont capables de s'agréger entre elles pour former un réseau tridimensionnel (Norris et *al.*, 1998) (Figure 11). Cette agrégation est responsable du caractère visqueux et filant de la salive. Au pH physiologique de l'environnement buccal, le mucus possède une charge négative grâce à l'acide sialique (3,8-4%) et aux résidus de sulfate (3,5-3,7%) (Slomiany et *al.*, 1996). Une connaissance des propriétés physicochimiques du mucus apporte des éléments essentiels pour développer une forme mucoadhésive pour la voie buccale. La théorie de la mucoadhésion est détaillée dans le paragraphe 3.3.2. de ce chapitre.

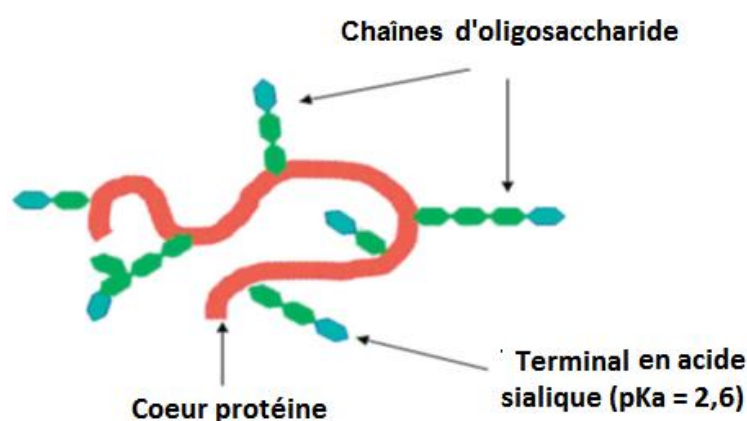


Figure 11 : Structure générale de la mucine (Khutoryanskiy, 2011)

3. Absorption du PA à travers la muqueuse buccale

En ce qui concerne les caractéristiques de perméabilité, bien que le principal rôle de la muqueuse buccale consiste en une fonction de protection comme celui de la peau, cette barrière n'est pas absolue et certaines régions de la cavité buccale, comme la muqueuse sublinguale, présente une perméabilité importante. Cette dernière est largement utilisée pour administrer certains médicaments en cas d'urgence (Goswami et *al.*, 2008). De plus, la muqueuse buccale est en permanence humide, la surface est très hydratée et, la couche superficielle est non-kératinisée. De ce fait, elle présente une perméabilité accrue en comparaison de la peau. Selon le site d'absorption, la muqueuse buccale est entre 4 et 4000 fois plus perméable que la peau (Galey et *al.*, 1976). En revanche, la muqueuse buccale est

moins perméable que la muqueuse intestinale en raison de la différence de structure (Figure 12).

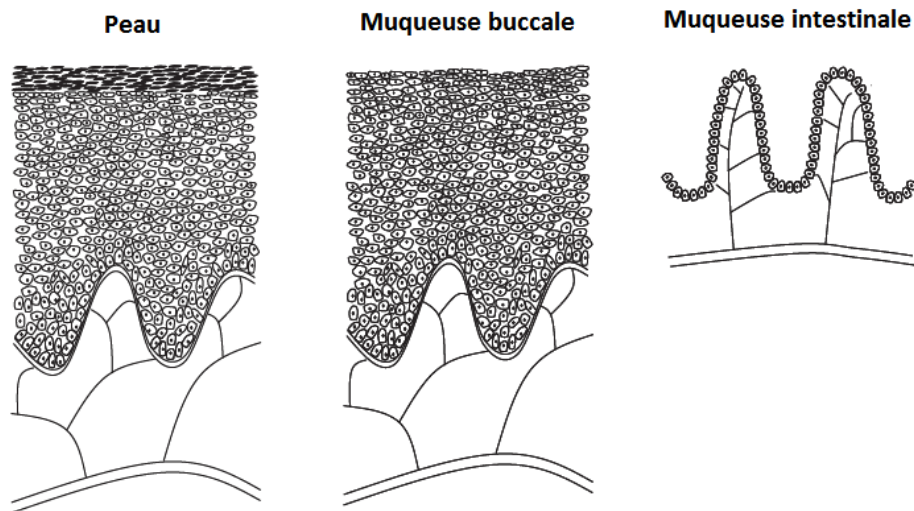


Figure 12 : Comparaison de la structure de la peau, la muqueuse buccale et la muqueuse intestinale (Nicolazzo et *al.*, 2005)

Dans le développement d'une formulation destinée à la voie transbuccale, la dynamique de perméabilité peut être différente en fonction de trois principaux facteurs : l'environnement physiologique, la nature de la molécule administrée et la composition de la formulation (Figure 13).

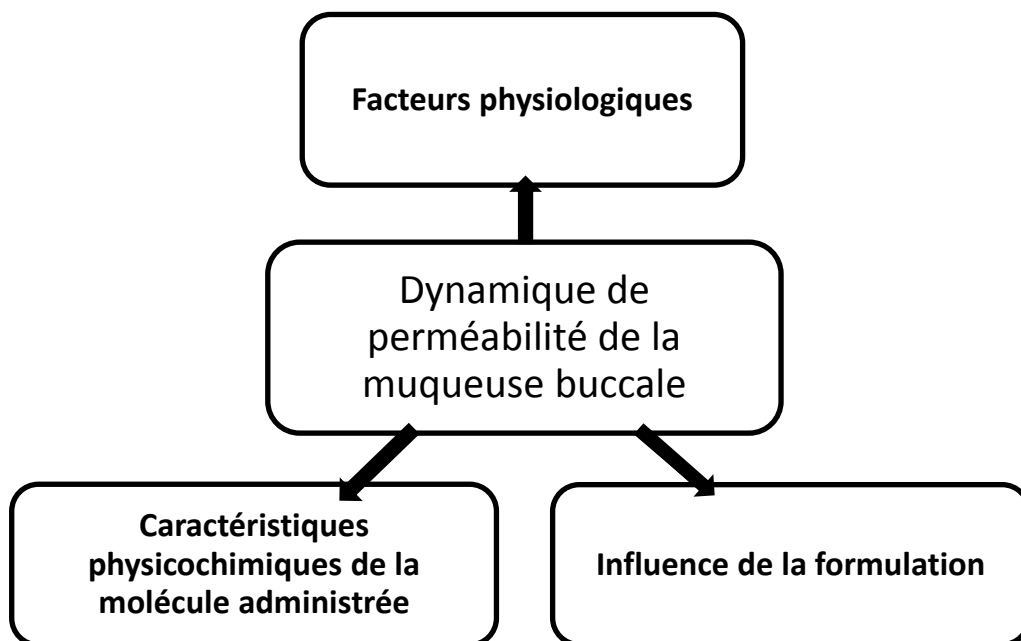


Figure 13 : Facteurs potentiels qui peuvent impacter la dynamique de perméabilité de la muqueuse buccale

3.1. Influence de l'environnement physiologique

Dans la partie anatomie, il a été vu précédemment que la structure et l'épaisseur de la muqueuse dans la cavité buccale pouvaient être très différentes. Ces différences entraînent donc une perméabilité variable selon le site d'application du médicament. L'épithélium superficiel, qui différencie les muqueuses, est une des barrières importantes à la pénétration (Shojaei, 1998). Selon l'aspect anatomique, en tant que couche protectrice, l'épithélium présente d'importantes variations morphologiques et structurales le divisant en deux types : kératinisé au palais dur et à la gencive, non-kératinisé pour le palais mou, la région sublinguale, la muqueuse alvéolaire et la joue. Généralement, en fonction de l'épaisseur et le degré de kératinisation (Tableau 8), le niveau de perméabilité varie selon l'ordre suivant : sublingual > buccal > palatal et gingival (Harris et Robinson, 1992). Prenant en compte cette variabilité, différentes approches pour la délivrance du médicament sont proposées (Paderni et al., 2012) (Figure 14). Les muqueuses kératinisées gingivale et palatale, ne sont pas encore considérées comme site d'absorption pour atteindre un effet systémique. En revanche, pour des affections locales au niveau de la gencive ou du palais dur, une thérapie efficace peut être obtenue avec de grandes chances de succès avec un actif concentré. La muqueuse tapissant la face interne des joues constitue le meilleur site d'application d'un système de libération tant en termes de perméabilité que d'acceptabilité.

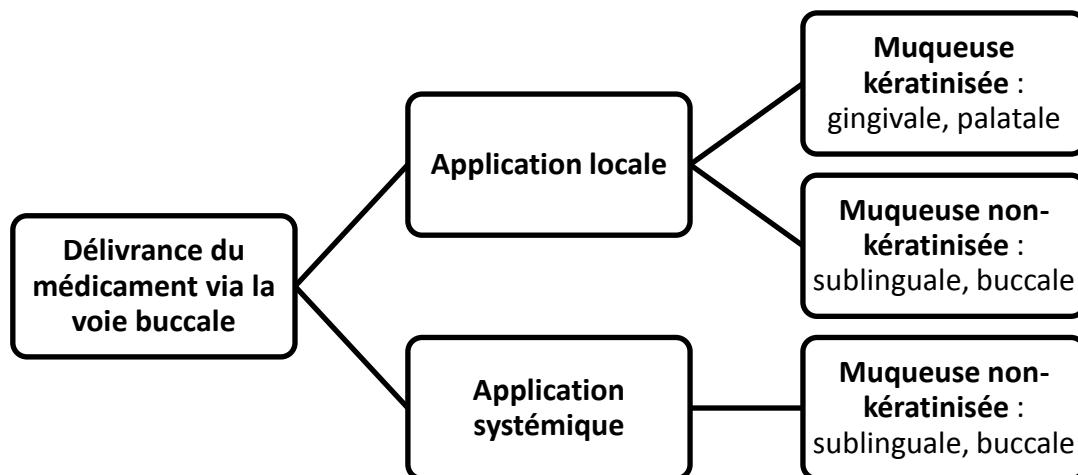


Figure 14 : Les approches possibles de la délivrance du médicament via la voie buccale au regard des propriétés anatomiques des muqueuses

Les principaux mécanismes intervenant dans la pénétration des molécules à travers la muqueuse buccale sont : La diffusion passive (paracellulaire, transcellulaire), la diffusion facilitée avec transporteur : soit à l'aide d'un transport actif spécifique soit par endocytose. De nombreuses études montrent que le passage résulte d'une diffusion passive, comme dans le cas de la peau (Salamat-Miller et *al.*, 2005). Deux phénomènes de diffusion passive peuvent coexister (Figure 15) : l'un à travers les espaces entre les cellules (passage paracellulaire), l'autre à travers les cellules (passage transcellulaire) (Mashru et *al.*, 2005). Dans le premier cas, les matrices de l'épithélium doivent être suffisamment relâchées pour obtenir une affinité acceptable entre la molécule et le liquide intercellulaire. La surface d'absorption du passage transcellulaire est beaucoup plus importante que celle du passage paracellulaire. Cependant, ce passage présente une résistance plus importante du fait que la molécule doit pouvoir traverser les milieux aqueux et lipidique dans les cellules épithéliales. Généralement, ces deux types de passage peuvent simultanément être impliqués. L'un peut être plus important que l'autre en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule, i.e. la taille, la liposolubilité et la charge (Rathbone et Tucker, 1993).

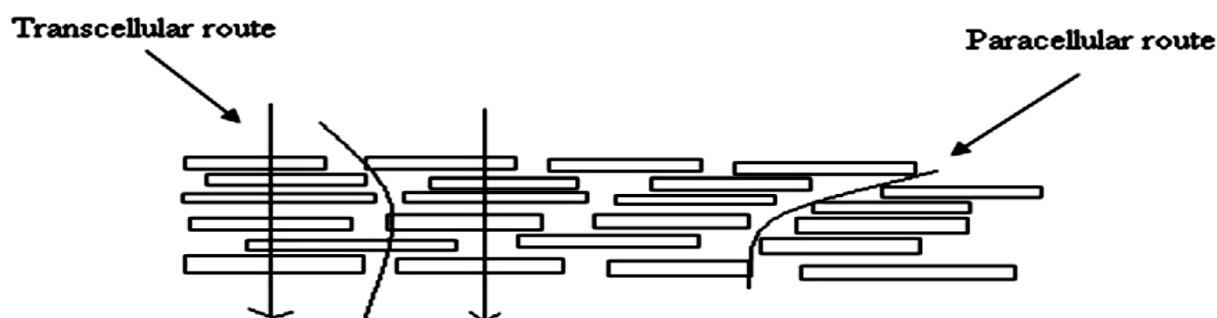


Figure 15 : Différentes voies potentielles de pénétration transmuqueuse (Patel et *al.*, 2011)

Quel que soit le mécanisme du passage transmuqueux, avant de se retrouver dans la veine, la molécule administrée doit interagir avec de nombreuses couches cellulaires, dont chacune peut se révéler être une barrière. Certains auteurs ont évoqué que l'imperméabilité du tissu épithélial buccal est avant tout due à la substance excrétée par les corps d'Odland dans l'espace intercellulaire, qui sont aussi connus sous le nom « membrane coating granules » (MCGs) (Gandhi et Robinson, 1994). Les MCGs sont des organites sphériques ou ovales de 100-300 nm de diamètre qui sont trouvés dans les cellules épithéliales kératinisées mais aussi non-kératinisées. Leurs fonctions consistent à produire des substances permettant l'adhésion entre les cellules, ou de rendre la barrière imperméable. Généralement, l'espace intercellulaire

est constitué principalement par des complexes macromoléculaires de protéines (mucine) qui peuvent fixer de grandes quantités d'eau, favorisant ainsi la diffusion de molécules hydrophiles. Néanmoins, le comblement progressif de l'espace intercellulaire par les produits d'extrusion lipidiques des corps d'Odland lui confère des propriétés lipophiles très marquées.

Un autre facteur qui peut influencer le passage de la molécule administrée par la voie transbuccale est la présence de la salive. Comme nous l'avons mentionné, la salive fournit à la cavité buccale un environnement riche en eau qui peut favoriser la libération du PA surtout dans les systèmes à base de polymères hydrophiles. Néanmoins, le flux de salive peut conduire à déglutir prématurément le médicament avant que l'absorption transbuccale n'ait eu lieu. Ce phénomène est bien connu comme le concept de «saliva wash out ». Par ailleurs, les enzymes dans la salive contenant un taux modéré de carbohydases et phosphatases, peuvent entraîner une dégradation de la molécule (Swarbrick et Boylan, 2000).

Dans la salive, plusieurs enzymes protéolytiques sont aussi présentes (Veuillez et *al.*, 2001). Les aminopeptidases sont considérées comme la principale barrière enzymatique limitant l'absorption des peptides (Walker et *al.*, 2002).

3.2. Influence des propriétés physicochimiques la molécule administrée

En ce qui concerne les caractéristiques physicochimiques de la molécule administrée, les principaux paramètres intéressants sont : la masse moléculaire, la liposolubilité et le pKa. En général, l'absorption buccale diminue au-delà d'un poids moléculaire de 300 Da. Dans les travaux réalisés par Beckett et collaborateurs (Beckett et Moffat, 1971, 1969, 1968), il est démontré que la capacité du passage transbuccal d'une série d'acides et bases est fonction de leurs solubilités lipidiques exprimées par le coefficient de partage huile/eau. Ces études indiquent que plus la molécule est liposoluble, plus sa capacité de pénétration est élevée. Il est possible de corrélérer les résultats d'absorption avec les liposolubilités des molécules. Le pKa de la molécule administrée et le pH de la cavité buccale déterminent le degré d'ionisation de la molécule qui est aussi un facteur influençant la liposolubilité de la molécule.

3.3. Influence de la formulation

Un système d'administration de médicament (drug delivery system) est développé, principalement sur la base des propriétés physicochimiques de la molécule active, des conditions physiologiques de la muqueuse buccale, ainsi que de l'objectif thérapeutique (Figure 16).

En fonction de l'action thérapeutique attendue, la formulation peut être développée pour obtenir des propriétés spécifiques vis-à-vis d'un site plus spécifique. Par exemple, une

dissolution accélérée de la forme doit être assurée dans le cas d'un médicament d'action rapide, pour cela, des agents effervescent sont souvent présents dans la formulation. La muqueuse sublinguale de faible épaisseur est un site idéal pour cette application. En revanche, quand une action prolongée d'un médicament est recherchée, il est possible de modifier la formulation en variant le type d'excipient, les quantités utilisées, mais également le process de fabrication. Dans ce cas, la muqueuse jugale moins perméable peut être préférée à la voie sublinguale.

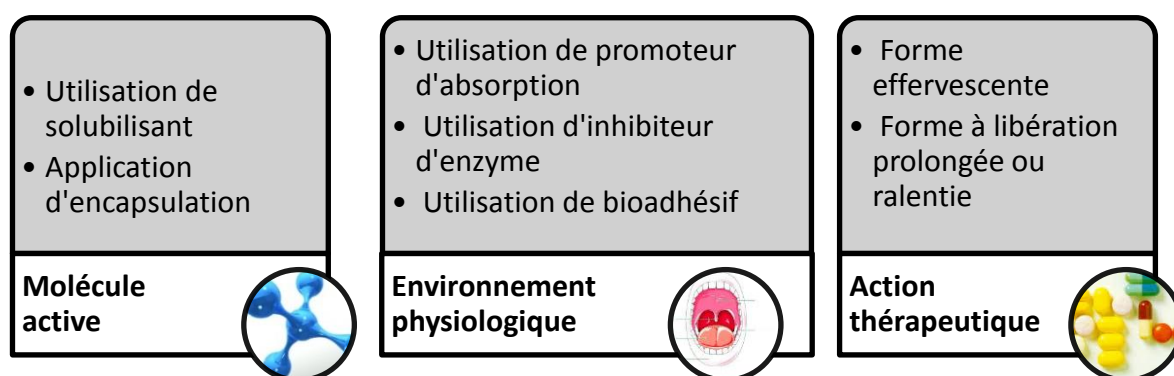


Figure 16 : Considération générale pour le développement d'une formulation destinée à la voie buccale

3.3.1. Solubilisant et promoteur d'absorption

En fonction des caractéristiques physicochimiques du principe actif, des excipients fonctionnels peuvent être incorporés dans la formulation pour améliorer l'efficacité et l'acceptabilité du médicament. C'est par exemple, dans le cas de certains principes actifs de faible solubilité, une cyclodextrine peut être utilisée, ce qui améliore leur absorption à travers la muqueuse buccale (Jain et *al.*, 2002).

Par ailleurs, la perméabilité de la muqueuse buccale peut être augmentée par des molécules dites promoteurs d'absorption. Leurs modes d'action consistent à modifier la fluidité de la membrane cellulaire, la structure ou la rhéologie du mucus, en extrayant les lipides intercellulaires et/ou intracellulaires (Hassan et *al.*, 2010). Un promoteur d'absorption idéal doit être non-toxique et non-irritant, son action doit être efficace et réversible. Après le retrait de matériel, le tissu doit immédiatement et complètement revenir à l'état initial. Les principaux promoteurs d'absorption sont présentés ci-dessous :

- Sels biliaires : ce sont des sels d'acide cholanique naturels ou synthétisés. Les plus utilisés dans la formulation transbuccale sont le désoxycholate sodique, le

taurocholate sodique, le glycocholate sodique, le taurodihydrofusidate sodique (Hassan et *al.*, 2010). Ce sont des tensioactifs naturels, capables de former des micelles de lipides dans l'espace intercellulaire créant des canaux aqueux, permettant le transport paracellulaire. Généralement, les effets de sels biliaires sont réversibles.

- Surfactants synthétiques : les plus connus sont les tensioactifs anioniques (le lauryl sulfate de sodium, le dodecyl sulfate de sodium) et non-ioniques (les esters, le laureth-9, les polysorbates 20 et 80). Il est démontré que le lauryl sulfate de sodium est plus efficace que les sels biliaires (Attia et *al.*, 2004). Leur mécanisme est similaire.
- Chélateurs : les chélateurs comme l'EDTA, l'acide citrique et les salicylates, peuvent former des complexes avec les ions calciques, cela permet de maintenir la dimension de l'espace intracellulaire.
- Acides gras et leurs dérivés : cette gamme de promoteurs d'absorption est capable de réduire l'épaisseur de la couche d'eau adjacente à la muqueuse buccale et de perturber l'organisation structurale de lipides intercellulaires (Lee, 1990). Les exemples typiques sont l'acide oléique, l'acide caprylique et l'acide laurique.
- Cyclodextrines : l'effet des cyclodextrines est dû à l'inclusion du cholestérol membranaire modifiant ainsi la fluidité de la membrane. Ils peuvent aussi ouvrir les jonctions serrées favorisant le passage intercellulaire (Marttin et *al.*, 1999, 1997).
- Chitosan et ses dérivés : les dérivés de poly(acide acrylique) faiblement réticulés ainsi que les dérivés du chitosan sont des promoteurs d'absorption non-toxiques pour les PA hydrophiles. Le mécanisme est lié à l'ouverture réversible des jonctions serrées du tissu muqueux sans interagir avec les composants membranaires.
- Autres : Azone® (1-dodecylazacycloheptan-2-one) est une substance hydrophile spécialement développée comme agent de pénétration dermique (Engblom et *al.*, 1995; Stoughton et McClure, 1983), qui ne cause pas d'interactions avec les protéines. L'Azone® agirait uniquement au niveau de la diffusion intercellulaire (Barry, 1987).

Actuellement, si beaucoup d'études démontrent l'efficacité de divers promoteurs d'absorption, aucune spécialité pharmaceutique administrable par voie transbuccale ne contient ce type adjuvant.

3.3.2. Agent mucoadhésif

L'autre facteur qui influence l'absorption de la molécule est la rétention de la forme sur le site d'application. L'utilisation de polymères mucoadhésifs présente un réel atout dans ce contexte afin de pouvoir maintenir un contact fort et prolongé entre la forme galénique et la muqueuse buccale. Une durée d'absorption prolongée peut résulter de leur incorporation.

3.3.2.1. Fondamentaux de la mucoadhésion

Le terme bioadhésion est défini comme un « attachement d'une macromolécule naturelle ou synthétique au mucus ou à une surface épithéliale » (Mathiowitz et *al.*, 1999).

La bioadhésion est donc une adhésion prolongée entre deux matériaux dont l'un au moins est de nature biologique. Elle indique la capacité d'un matériau (synthétique ou biologique) à adhérer sur un tissu biologique pour un temps prolongé. Dans le domaine des systèmes de libération de principes actifs, la bioadhésion implique la fixation d'un tel système à une surface biologique spécifique. Cette surface peut être un tissu épithélial ou le mucus recouvrant ce tissu. Dans ce dernier cas, le phénomène peut aussi être appelé mucoadhésion.

Les mécanismes de mucoadhésion ne sont pas encore entièrement connus, mais les principales théories s'appuient sur les interactions physico-chimiques entre l'excipient mucoadhésif et la mucine et/ou la surface épithéliale. Il existe six théories pour expliquer le phénomène de mucoadhésion : hydratation, adsorption, diffusion-interpénétration, interaction électronique, fracture, et ancrage mécanique (Andrews et *al.*, 2009).

- La théorie d'adsorption est la plus communément admise : elle repose sur la mise en jeu d'interactions atomiques de surface entre le mucus et les polymères mucoadhésifs entraînant la formation de liaisons de faible énergie comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes (Khutoryanskiy, 2011). Les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes sont les interactions typiques pour la mucoadhésion en raison de leur rapidité et leur réversibilité. Ces interactions se forment lors du contact initial entre le mucus et les polymères mucoadhésifs.
- La théorie d'hydratation dépend de la tension interfaciale entre le mucus et le polymère mucoadhésif. Elles déterminent aussi l'étalement du polymère sur la

surface de la muqueuse. Cette théorie est principalement appliquée pour les formes liquides.

- La théorie de diffusion-interpénétration repose sur les propriétés des polymères telles que la flexibilité des chaînes, la similitude de structure chimique avec la mucine, le coefficient de diffusion ainsi que le temps de contact. Ces paramètres favorisent la diffusion des chaînes du polymère mucoadhésif dans le réseau de mucus, et permettent l'enchevêtrement de ces deux polymères (Peppas et Sahlin, 1996).
- La quatrième théorie est celle des interactions électroniques. Grâce aux différentes propriétés électroniques de la mucine (charge négative) et des polymères mucoadhésifs, lors du contact, il y a transfert d'électrons et formation d'une double couche électronique à l'interface adhésif-substrat. L'adhésion découle des forces attractives au travers de cette double couche (Dodou et *al.*, 2005).
- D'après la théorie de fracture, le lien adhésif entre les systèmes est relié à la force nécessaire pour les séparer (Khutoryanskiy, 2011).
- Quant à la théorie d'ancrage mécanique, la rugosité de la surface est prise en considération. L'adhésion est favorisée par une surface de contact plus étendue. Cette théorie est importante pour les matières rugueuses et poreuses (Khutoryanskiy, 2011).

Le phénomène de mucoadhésion ne peut pas être expliqué par une seule de ces théories. En effet, plusieurs mécanismes peuvent interagir. En conséquence, afin de décrire le procédé de mucoadhésion, certains chercheurs préfèrent décomposer le phénomène en phases séquentielles et où chacune d'entre elles est associée à un mécanisme différent (Smart, 2005).

L'adhésion commence par l'hydratation et le gonflement du polymère (la théorie d'hydratation), ensuite les liaisons non-covalentes se forment à l'interface mucus/polymère (théories d'adsorption et des interactions électroniques). Pour former des liaisons secondaires, les chaînes de polymère et de mucine s'interpénètrent et s'enchevêtrent ensemble (théorie de diffusion-interpénétration) (Figure 17).

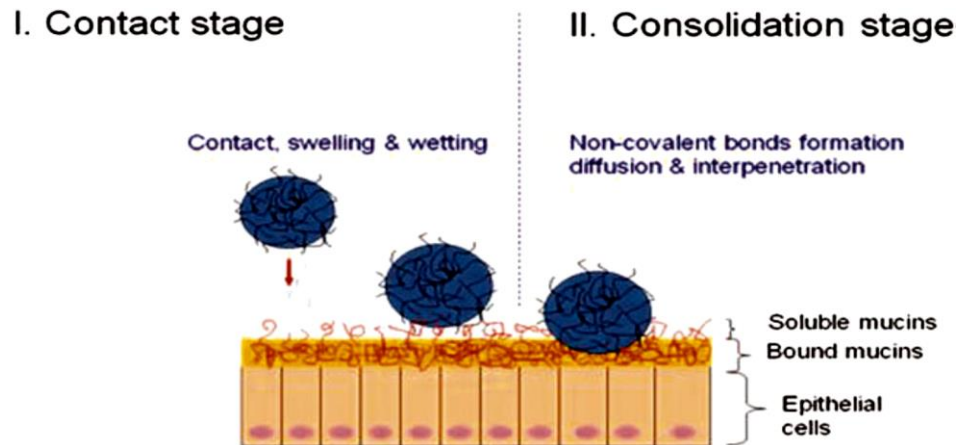


Figure 17 : Etapes de contact et de consolidation de la mucoadhésion (Smart, 2005)

3.3.2.2. Exemples de polymères mucoadhésifs

Diverses familles de polymères ont été étudiées pour répondre aux exigences d'un polymère mucoadhésif. Généralement, des caractéristiques structurales telles que la présence de groupes fonctionnels forts accepteur ou donneur de liaisons hydrogènes, un poids moléculaire élevé, une flexibilité suffisante des chaînes, la présence de charges, et des propriétés de surface, permettent de favoriser la mucoadhésion (Lee et *al.*, 2000). Par ailleurs, le polymère ne doit provoquer ni réponse immunologique, ni réaction inflammatoire ou toxique.

Il existe plusieurs façons de classifier ces polymères mucoadhésifs : par la source, synthétique ou naturelle ; par l'hydrosolubilité ; par la charge (Tableau 10). D'après la classification utilisée par Patel et *al.* (Patel et *al.*, 2011) : les polymères mucoadhésifs sont classés en première et deuxième génération.

Les polymères de première génération peuvent être divisés en trois catégories : cationique, anionique et non-ionique. Généralement, les polymères anioniques et cationiques montrent une capacité de mucoadhésion plus forte que les composés non-ioniques (Ludwig, 2005).

Les polymères anioniques sont les plus largement utilisés dans la formulation pharmaceutique. Par ailleurs, ils ont une faible toxicité. Les exemples typiques sont les acides polyacryliques (Carbopol®) et leurs dérivés légèrement réticulés, la carboxyméthylcellulose de sodium (CMC Na), l'alginate de sodium et la pectine. Il est à noter que le pH de l'environnement buccal joue un rôle très important sur l'effet mucoadhésif de ces polymères car il conditionne l'ionisation du polymère. La viscosité et la force mucoadhésive d'un gel de Carbopol® sont augmentées lors de la neutralisation (Shin et *al.*, 2000). En effet, le pKa des Carbopols® est de $6,0 \pm 0,5$. Quand le pH est supérieur à la valeur de pKa, les groupements

d'acide carboxylique sont ionisés et les chaînes se raidissent à cause de la répulsion électrostatique, ce qui entraîne la gélification du Carbopol®. Dans le cas du Carbopol® 934, la viscosité et la mucoadhésion sont obtenues au-delà de pH 6.

Tableau 10 : Classification des polymères bioadhésifs utilisés pour la muqueuse buccale (Salamat-Miller et *al.*, 2005)

Critères	Catégories	Exemples
Source	Semi-naturels/naturels	Agarose, chitosan, gélatine Acide hyaluronique Gommes (guar, xanthane, gellane, carraghénane, pectine, et alginate)
	Synthétiques	Dérivés celluloseux [CMC, CMC thiolaté, CMC de sodium, HEC, HPC, HPMC, MC, MHEC] Polymères à base de Poly(acide acrylique) [CP, PC, PAA, polyacrylates, poly(méthacrylate), poly(alkylcyanoacrylate), poly(isohexylcyanoacrylate), poly(isobutylcyanoacrylate), copolymère de l'acide acrylique et PEG] Autres Poly(N-2-hydroxypropyl méthacrylamide) (PHPMam), polyoxyéthylène, PVA, PVP, polymers thiolatés
Hydrosolubilité	Soluble	CP, HEC, HPC (<38°C), HPMC (eau froide), PAA, CMC de sodium, alginate de sodium
	Insoluble	Chitosan (soluble dans l'acide dilué), EC, PC
Charge	Cationique	Aminodextran, chitosan, diméthylaminoéthyl (DEAE)-dextran, triméthyl chitosan
	Anionique	Chitosan-EDTA, CP, CMC, pectine, PAA, PC, alginate de sodium, CMC de sodium, gomme xanthane
	Non ionique	Hydroxyéthylamidon, HPC, PEG, PVA, PVP, scleroglucane
Mécanisme de la bioadhésion	Covalente	Cyanoacrylate
	Liaison hydrogène	Acrylates, CP, PC, PVA
	Interaction électrostatique	Chitosan

Parmi les polymères cationiques, le chitosan et ses dérivés sont les plus étudiés dans la littérature scientifique. Il s'agit d'un polysaccharide cationique produit par la désacétylation de la chitine qui est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans le monde, après la cellulose (He et *al.*, 1998). Son mécanisme de mucoadhésion résulte des interactions électriques entre ses fonctions amines primaires et les groupements d'acide sialique et d'acide sulfonique présents dans le mucus (Rossi et *al.*, 2000). Il a été démontré que la formation de liaisons hydrogène et les effets hydrophobes participent aussi à l'effet de mucoadhésion de ce polymère (Sogias et *al.*, 2008). De plus, le chitosan est biocompatible et biodégradable (Portero et *al.*, 2007).

En revanche, les polymères non-ioniques sont moins efficaces, la théorie intervenant dans leur mécanisme de mucoadhésion est celle de la diffusion-interpénétration (Figure 18).

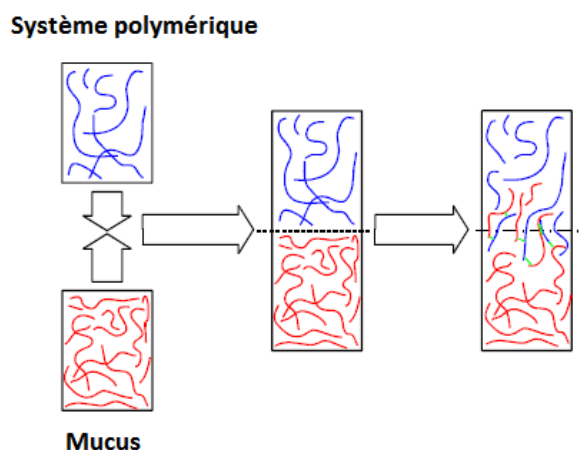
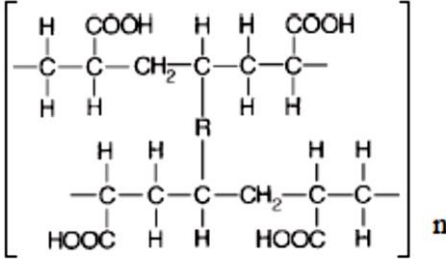
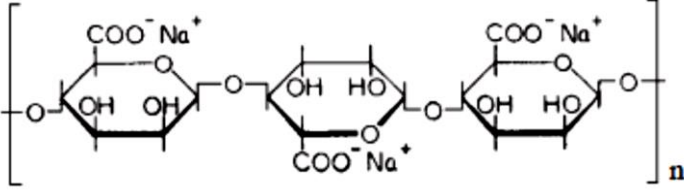
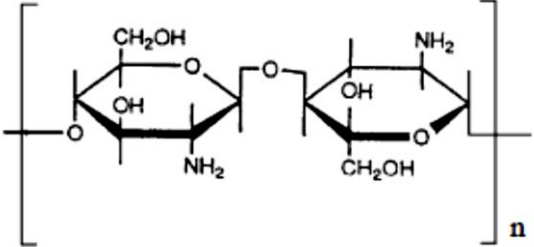
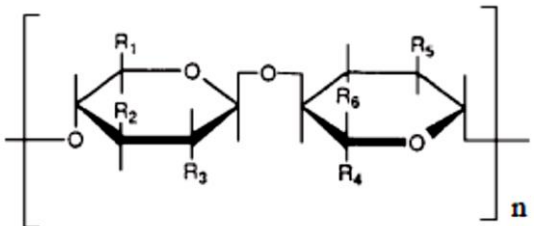


Figure 18 : Phénomène de diffusion dans la mucoadhésion

Les dérivés cellulosiques comme l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), la méthylcellulose (MC) et l'hydroxypropylcellulose (HPC) sont des exemples de polymère mucoadhésif non-ionique. Les principaux exemples de ces polymères sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Principaux polymères mucoadhésifs issus de la première génération (Asane et al., 2008)

Polymère bioadhésif		Propriétés physicochimiques
Poly(Acide acrylique) 	Polycarbophil (R = divinyl glycol)	• PM = $2,2 \times 10^5$; • η 2 000-22 500 cps (1% sol aq) ; • Soluble dans milieu acide ; • Réticulation dépend du pH
	Carbopols (R = allyl pentaerythritol)	• PM = $(1 - 4) \times 10^6$; • η 29 400-39 400 cps (0,5% sol aq, 25°C) ; • Soluble dans l'eau ; • Epaississant, gélifiant
Alginate de sodium 		• PM = $(0,2-2,4) \times 10^5$; • η 20-400 cps (1% sol aq) ; • Soluble dans l'eau ; • Epaississant, gélifiant, émulsifiant et stabilisant
Chitosan 		• PM = $(0,5-20) \times 10^5$; • η < 2000 cps (1% dans 1% acide acétique) ; • Soluble au milieu acide ; • Gélifiant
Dérivés cellulosiques 	CMC Na (R1, R4 = CH2OH; R2, R3, R5 = OH; R6 = OCH2CO2 Na ⁺)	• PM = $9 \times 10^4 - 7 \times 10^5$; • η 1 200 cps (1% sol aq) ; • Soluble dans l'eau ; • Gélifiant, émulsifiant
	HPMC (R1 = CH2OCH3; R2 = OH, R3 = OCH2CHOHCH3; R4 = CH2OH; R5, R6 = OCH3)	• PM = $8,6 \times 10^4$; • η 15 – 4 000 cps (1% sol aq) • Soluble dans l'eau froide ; • Gélifiant, épaississant

Les polymères mucoadhésifs de première génération correspondent à des polymères non-spécifiques, qui manquent de pouvoir de ciblage. Les interactions chimiques entre le polymère et le mucus ou le tissu superficiel sont généralement non-covalentes (liaison hydrogène, interactions hydrophobes ou électrostatiques pour la plupart). Leur inconvénient est le temps de persistance relativement court du fait du renouvellement du mucus. Pour cette raison, les chercheurs ont développé des plateformes de polymères moins sensibles au renouvellement du mucus. Ils constituent la deuxième génération. Ces polymères mucoadhésifs peuvent adhérer directement à la surface des cellules épithéliales, plutôt qu'au mucus, en interagissant avec des récepteurs spécifiques formant des liaisons covalentes.

Les lectines sont des protéines naturelles qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains carbohydrates. Elles interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (e.g. immunité, infection). Après s'être liées aux cellules, les lectines peuvent soit rester à la surface des cellules, soit être internalisées par endocytose dans le cas de l'adhésion à un récepteur (Clark et *al.*, 2000). Malgré leurs avantages significatifs au niveau du ciblage, la plupart des lectines sont toxiques et immunogènes, et leur tolérance au niveau de la muqueuse buccale est peu connue.

Les thiomères sont un type de polymères mucoadhésifs de deuxième génération dérivés de polymères hydrophiles comme les polyacrylates, le chitosan ou la gomme gellane désacétylée (Leitner et *al.*, 2003). Ces polymères modifiés contiennent des groupes thiols qui forment des liaisons covalentes avec les résidus cystéine. Ils présentent des propriétés mucoadhésives nettement améliorées.

Bien que les polymères mucoadhésifs de deuxième génération présentent des intérêts comme l'augmentation du temps de présence sur le site d'administration, l'adhésion par ciblage et l'inhibition d'enzymes, l'utilisation de ces polymères dans le système buccal reste encore marginale. Des investigations approfondies au niveau biologique sont encore nécessaires pour s'assurer de l'innocuité de ces polymères (Salamat-Miller et *al.*, 2005).

3.3.2.3. Gomme xanthane et ses applications

Dans ce travail, la sélection d'un polymère mucoadhésif d'origine naturelle, à la fois efficace, bien toléré et possédant un grand recul quant à son utilisation a été effectuée. Le polymère doit être, en outre, compatible avec le salbutamol, également stable sur une gamme large de pH.

La gomme xanthane remplissait ces critères. Mentionnée dans le Handbook of Pharmaceutical Excipients (5^{ème} édition) (Rowe et *al.*, 2005), la gomme xanthane est

Dans le domaine pharmaceutique, la gomme xanthane est non seulement utilisée comme épaississant ou émulsifiant dans des formes liquides ou semi-solides, mais aussi dans des systèmes de délivrance à libération modifiée (Munday et Cox, 2000; Varshosaz et *al.*, 2006; Verhoeven et *al.*, 2006). Mughal et *al.* ont ainsi utilisé la gomme xanthane pour prolonger la libération du propranolol jusqu'à 24h avec une cinétique de type Higuchi (Mughal et *al.*, 2011).

Par ailleurs, ses propriétés mucoadhésives le rendent très utile dans la formulation des préparations ophtalmique (Shastri et *al.*, 2010), buccale (Ikeuchi-Takahashi et *al.*, 2013) et vaginale (Vermani et *al.*, 2002). L'interaction entre la gomme xanthane et la mucine (Ceulemans et *al.*, 2002) ou le gel de mucus (Madsen et *al.*, 1998a) a été évaluée à l'aide de techniques rhéologiques. L'analyse des valeurs de la viscosité intrinsèque et des modules viscoélastiques montrent qu'il existe une interaction significative entre les deux composés. Dans un travail d'Ikeuchi-Takahashi, la gomme xanthane a été incorporée comme un agent mucoadhésif dans les comprimés buccaux pour le traitement de l'aphte (Ikeuchi-Takahashi et *al.*, 2013).

3.3.3. Autres agents : Inhibiteurs d'enzyme, régulateurs du pH

Bien que l'activité des enzymes dans la cavité buccale soit relativement faible comparée aux autres voies muqueuses, des substances comme les peptides et les protéines, peuvent tout de même être dégradées par ces enzymes dans la salive. Pour cette raison, des inhibiteurs d'enzyme peuvent être incorporés dans la formulation pour améliorer la biodisponibilité de PA. Il est démontré que plusieurs polymères mucoadhésifs comme poly(acide acrylique) (polycarbophil et Carbopol®) ont la capacité d'inhiber certaines enzymes protéolytiques (trypsine, α -chymotrypsine, carboxypeptidases A et B, et aminopeptidase leucine) (Luessen et *al.*, 1999).

Par ailleurs, la valeur du pH peut être un critère important dans l'absorption de substances ioniques. L'absorption maximale s'observe aux pH pour lesquels le principe actif se présente sous une forme non ionisée. La salive ayant un pouvoir tampon très faible pour maintenir le pH entre 5,3-7,8 dans la cavité buccale, l'ajout de régulateurs de pH peut s'avérer nécessaire afin de moduler temporairement le microenvironnement au site d'application. Ceci permettra donc d'obtenir une meilleure absorption. Le pH peut être aussi important pour certains polymères mucoadhésifs (Carbopol®, chitosan) pour exprimer leur capacité de mucoadhésion.

Actuellement, l'utilisation de nanoparticule est aussi beaucoup développée dans le système de délivrance par la voie buccale. Les principales formes sont les liposomes et polymersomes. (Hearnden et *al.*, 2012).

4. Méthodes d'évaluation d'une formulation appliquée à la voie buccale

Avant de développer les méthodes d'évaluation, il importe de décrire les différentes phases concernant le devenir d'un médicament *in vivo* (Figure 20). Lorsqu'un médicament est administré par la voie buccale, dans le cas des formes solides où le PA se présente sous forme de particules, il doit d'abord être dissous et donc passer à l'état moléculaire afin d'être absorbé et d'exercer une activité thérapeutique. Dans le cas des systèmes matriciels ou semi-solides, il s'agit d'abord d'une libération du PA à partir de la forme.

En conséquence, trois critères principaux peuvent déterminer la biodisponibilité et le comportement pharmacocinétique du médicament (Figure 21) :

- Dissolution ou libération du PA
- Temps de présence de la forme sur le site biologique
- Perméabilité du PA à travers la muqueuse buccale

La présentation des principales modalités d'évaluation va préciser les caractéristiques, les performances mais aussi les limites des techniques pouvant être mises en place et apportera un éclairage préalable à la présentation de nos travaux et de leur discussion.

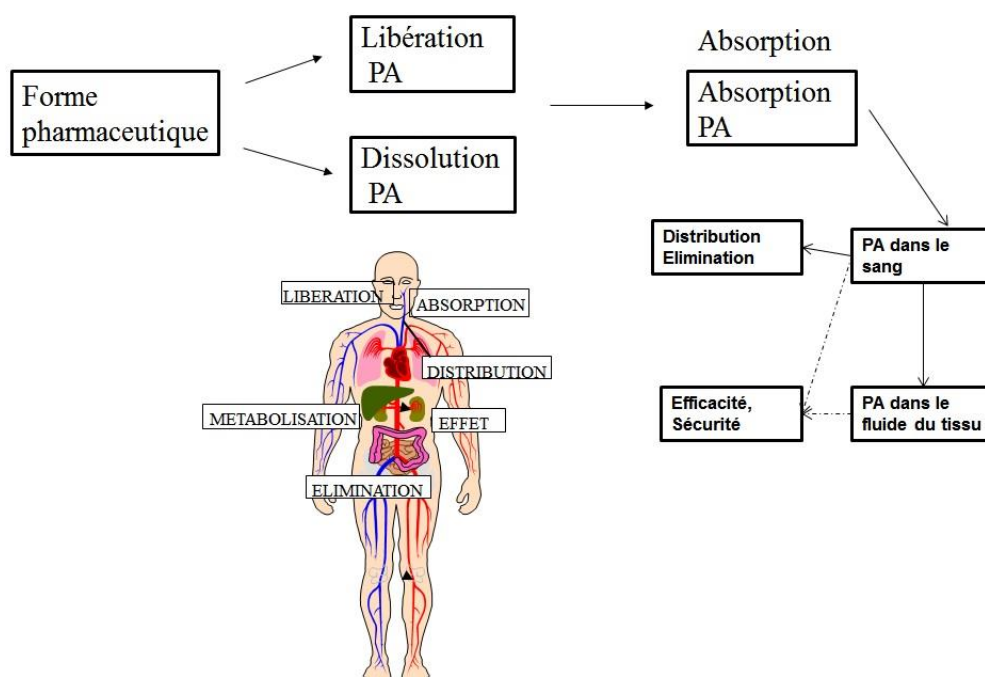


Figure 20 : Devenir d'un médicament administré par la voie transbuccale

Libération du PA	Temps de présence de la forme	Perméabilité
• Essai de dissolution	• Essai de mucoadhésion <i>in vitro</i> • Essai de mucoadhésion <i>in vivo</i>	• Essai de perméabilité <i>in vitro</i> • Essai d'absorption <i>in vivo</i>, étude pharmacocinétique

Figure 21 : Evaluations générales envisagées d'un médicament administré par la voie (trans)buccale

4.1. Essais de dissolution

Pour un médicament, quelle que soit sa voie de pénétration dans l'organisme, l'étape de dissolution ou de libération du PA à partir de la forme pharmaceutique est essentielle. Notamment dans le cas de formes solides, l'étape de dissolution peut être le facteur limitant l'apparition du PA dans la circulation sanguine.

Dans ce contexte, l'évaluation et le contrôle de l'étape de dissolution ou de libération par un essai adapté sont importants. Toute variation dans le profil de dissolution signifiera une modification des conditions de dissolution ou un changement des caractéristiques physicochimiques de la forme, et surtout une possible altération du profil pharmacocinétique.

Néanmoins, dans les Pharmacopées, il existe peu de procédures standardisées pour caractériser le comportement de dissolution d'une forme destinée à la voie buccale. Ici nous allons décrire les différents appareils de dissolution de référence ainsi que ceux qui en découlent pour les rendre plus proches de la voie buccale.

4.1.1. Appareils Pharmacopée USP et leurs applications

Il existe quatre appareils de dissolution de base : Appareils I, II, III et IV. Ils sont décrits dans le chapitre de Dissolution <711> de la Pharmacopée Américaine (USP) (U.S. Pharmacopeial Convention, 2013a). Les appareils V et VI sont issus des modifications des appareils I et II. Tandis que l'appareil VII est une adaptation de l'appareil III pour des formes spécifiques. Les schémas sont présentés dans la Figure 22.

Les appareils I à panier et II à palette sont les plus communément utilisés car ce sont historiquement les premiers appareils décrits comme appareils standardisés dans la littérature (Gray et al., 2009). La forme pharmaceutique à analyser est plongée dans un récipient ayant la

forme d'un bol sous agitation (à l'aide de palettes ou paniers) contenant un volume prédéfini de milieu de dissolution. Très simples et rapides à mettre en œuvre, ils sont en effet décrits dans la majorité des méthodes de contrôle de produit fini.

Dans l'USP, en ce qui concerne les formes destinées à la voie buccale, les tests de dissolution ne sont mentionnés que dans une seule monographie, celle du comprimé sublingual du Dinitrate d'Isosorbide. Dans la spécification, l'appareil II à palette tournante est appliqué avec 900 ml d'eau comme milieu de dissolution à une vitesse d'agitation de 50 rpm. Dans une étude sur des comprimés à application buccale, l'appareil I a été utilisé pour doser les PA hydrosolubles (Nafee *et al.*, 2004a). Dans une autre publication, les appareils I et II ont été plus ou moins modifiés et utilisés pour étudier la libération de la nicotine (Kanjyabat et Pongjanyakul, 2011). Evidemment, ces essais ne peuvent pas représenter le comportement *in vivo* au regard du volume de salive qui est beaucoup moins important (Patel *et al.*, 2012).

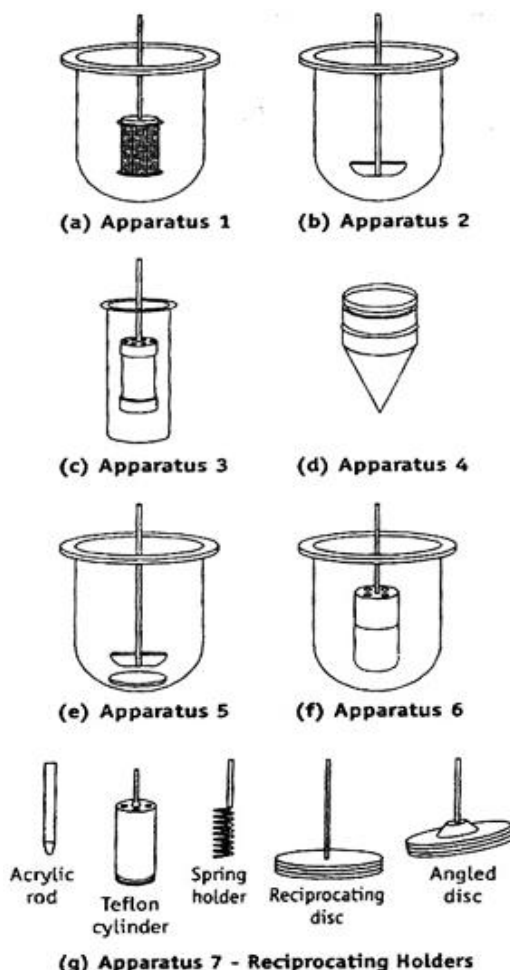


Figure 22 : Appareils de dissolution USP : (a) appareil I à panier, (b) appareil II à palette, (c) appareil III à piston, (d) appareil IV cellule à flux continu, (e) appareil V à disque, (f) appareil VI à cylindre, (g) appareil VII à supports alternatifs

Par ailleurs, il faut être vigilant sur certains points vis-à-vis de ces appareillages. De par sa conception, l'appareil I peut présenter des problèmes d'hétérogénéité du milieu de dissolution et/ou un mauvais dégazage de celui-ci en raison de la formation de bulles d'air sur la maille du panier au cours de la dissolution. Cela peut avoir un impact important sur les résultats de dissolution. De plus, ce type d'appareillage est incompatible avec des produits à base de polymères ou de gélatine du fait que le risque d'obstruction des mailles est majoré. D'un point de vue pratique, le nettoyage des paniers peut s'avérer particulièrement fastidieux.

L'appareil II est certes plus simple à nettoyer mais il présente d'autres inconvénients, notamment la formation d'un cône au fond du récipient de dissolution avec les excipients insolubles pendant le test. Cela peut perturber l'hydrodynamique de la dissolution et fausser ainsi les résultats. Afin de résoudre un autre inconvénient de l'appareil II engendré par les formes qui flottent dans le milieu, on utilise des lests (également appelés « sinkers ») qui peuvent influencer également l'hydrodynamique de l'agitation dans le récipient.

L'appareil III à piston ou cylindre réciproque, inspiré d'un appareil de désagregation, est composé d'un piston contenant la forme pharmaceutique à analyser plongée par mouvement vertical répétitif dans un tube contenant le milieu de dissolution. Il est commercialisé sous l'appellation « Bio-Dis » (Figure 23). Outre une consommation faible de volume de dissolution, l'appareil présente l'avantage de pouvoir changer de milieux au cours d'un même test de dissolution selon un ordre préétabli. Ainsi, les tubes peuvent être remplis de milieux de dissolution différents ayant un pH croissant, par exemple afin de simuler le transit gastro-intestinal pour l'évaluation d'une forme orale. Cela permet de réaliser un essai dit « biorelevant » (Jantratid et *al.*, 2009). Dans un travail sur des comprimés buccoadhésifs d'hémisuccinate d'hydrocortisone, les auteurs ont appliqué l'appareil III pour évaluer la dissolution suivant les mécanismes d'érosion et de diffusion (Fábregas et García, 1995).



Figure 23 : Appareil de dissolution Bio-Dis (<http://www.directindustry.fr/>, 2014a)

En ce qui concerne l'appareil IV à cellule à flux continu, l'échantillon est placé dans une cellule. Grâce à une pompe adéquate, le milieu de dissolution est introduit par la partie inférieure de la cellule afin d'obtenir un flux continu approprié, en circuit ouvert ou fermé (Figure 24-25). Cela permet de travailler aussi bien sur des principes actifs faiblement solubles en mode circuit ouvert que sur des principes actifs très solubles ou des formes peu dosées (nécessitant de faible volume de milieu de dissolution) en mode circuit fermé. L'USP précise que les débits du flux standard sont de 4, 8 ou 16 mL/min (U.S. Pharmacopeial Convention, 2013a). Comme pour l'appareillage III, il est possible de réaliser des changements de milieux en cours de test pour mimer les conditions physiologiques. Des chercheurs américains ont développé différentes méthodes de dissolution à base de l'appareil IV dans l'évaluation d'une forme transbuccale de nicotine. Leur objectif était de trouver une méthode plus pertinente afin de prédire les comportements *in vivo* (Delvadia et *al.*, 2012).



Figure 24 : Appareil USP IV (<http://www.directindustry.fr/>, 2014b)

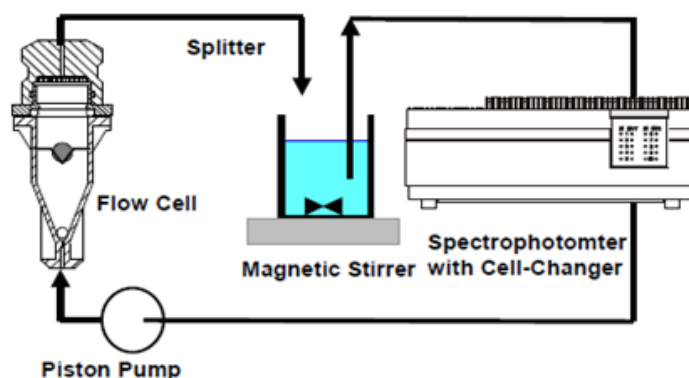


Figure 25 : Schéma de montage de l'appareil à flux continu, circuit fermé (Glantzmann et Raton, 2007)

L'appareil VII, inspiré de l'appareil III, était initialement adapté pour les formes transdermiques en fixant celles-ci sur un disque au bout du piston avec possibilité de travailler aussi bien avec des récipients de 300 mL que des tubes de 50 à 75 mL. Des supports variés ont été créés pour s'adapter à d'autres formes pharmaceutiques comme les formes à libération prolongée et les comprimés enrobés. Les divers appareils de dissolution et leurs applications sont présentés dans le Tableau 12 afin de sélectionner un appareil adapté à la forme testée.

Tableau 12 : Appareils de dissolution inscrits à la Pharmacopée Américaine USP

Appareil	Formes testées	Paramètres
Appareil I : Panier tournant	Formes conventionnelles, formes à libération immédiate, formes à libération prolongée ou retardée	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu
Appareil II : Palette tournante	Formes conventionnelles, formes à libération immédiate, formes à libération prolongée ou retardée	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu
Appareil III : Piston	Formes conventionnelles, formes à libération immédiate, formes à libération prolongée ou retardée	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu
Appareil IV : Cellule à flux continu	Formes conventionnelles, formes à libération immédiate, formes à libération prolongée ou retardée Comprimés, capsules, suppositoires, poudres, semi-solides, suspension etc...	Température, débit de flux, composition du milieu
Appareil V : Disque (variante de l'appareil II)	Formes semi-solides topiques, systèmes transdermiques	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu
Appareil VI : Cylindre (variante de l'appareil II)	Systèmes transdermiques	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu
Appareil VII : Supports alternatifs (variante de l'appareil III)	Systèmes transdermiques, formes à libération prolongée (comprimé enrobé)	Température, vitesse d'agitation, composition du milieu

4.1.2. Appareils pour étudier les formes semi-solides

D'autres appareils sont spécifiques à la forme pharmaceutique étudiée dans notre projet : les formes semi-solides.

L'USP décrit trois appareils qui reposent sur le même principe, à savoir la diffusion de l'actif à travers une membrane synthétique (U.S. Pharmacopeial Convention, 2013b).

Le premier (Vertical Diffusion Cell) est composé d'une cellule de Franz (Figure 26). L'échantillon est déposé dans le compartiment supérieur puis le PA diffuse à travers la membrane avant d'être recueilli dans le compartiment inférieur dans lequel circule un milieu de dissolution. Des travaux de recherche ont par le passé utilisé la cellule Franz dans le cas de gels (Karavana et *al.*, 2009) et de films buccaux (Singh et *al.*, 2010).

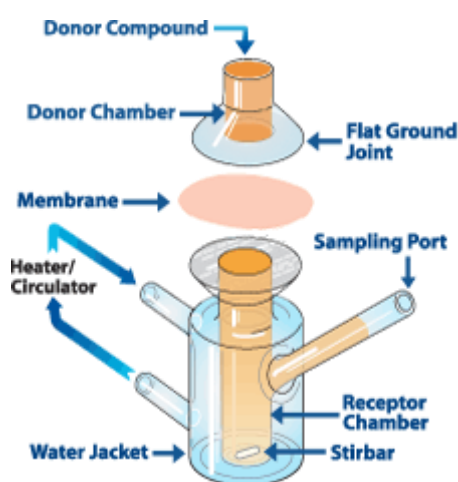


Figure 26 : Schéma représentant la cellule de diffusion de Franz

Le second appareil est adapté de l'appareil II (avec mini-palettes et des récipients dont les dimensions sont réduites) auquel a été rajoutée une cellule sous la palette. Celle-ci contient l'échantillon qui diffuse dans le récipient de dissolution à travers une membrane (Figure 27).

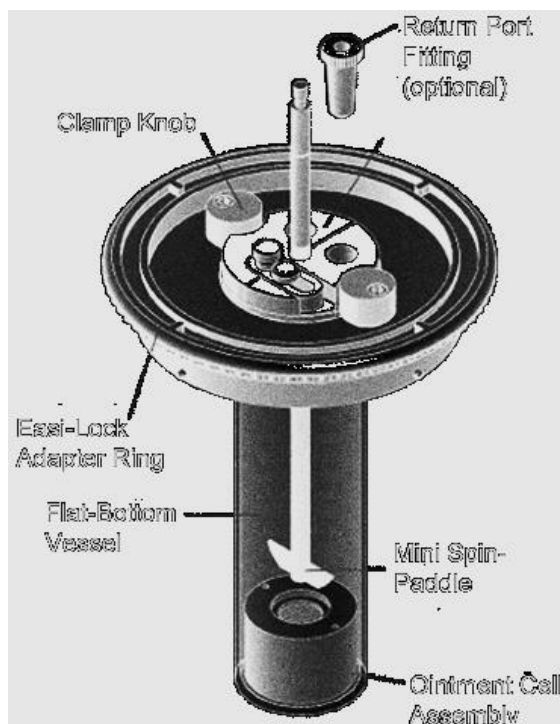


Figure 27 : Appareil mini-palette adapté pour les formes semi-solides (U.S. Pharmacopeial Convention, 2013b)

Le dernier appareil est adapté de l'appareil IV (flux continu). L'échantillon est simplement déposé dans le dispositif qui est constitué d'un réservoir et d'un anneau où se situe la membrane (Figure 28). Cet adaptateur, placé dans la cellule standard à flux continu, permet une mesure automatique et en ligne par rapport à la cellule Franz. Pour ces raisons, le dispositif pour les formes semi-solides » de l'appareil IV nous est apparu particulièrement adapté pour notre étude.



Figure 28 : Dispositif « adaptateur pour les formes semi-solides » de l'appareil IV

En résumé, bien qu'il existe de nombreux appareils de dissolution, l'étude sur une forme à application buccale nécessite plus d'attention à cause des conditions physiologiques

spécifiques. Afin de développer une méthode de dissolution biopertinente et relativement proche de la réalité, les paramètres tels que le pH, le volume du milieu ainsi que l'agitation hydrodynamique doivent être choisis avec soins. Par exemple le milieu de dissolution est celui de la salive, à savoir un tampon phosphate pH 6.8.

4.1.2. Modélisation et comparaison des profils de dissolution

4.1.2.1. Les modèles mathématiques

Les résultats obtenus dans les essais de dissolution de formes pharmaceutiques sont souvent représentés sous forme de courbes où la fraction cumulée de principe actif dissous ou libéré (Q_t/Q_0 , %) est exprimée en fonction du temps (t). L'application des modèles mathématiques facilite l'interprétation quantitative de ces résultats et la compréhension des mécanismes de libération du PA à partir de la forme pharmaceutique. Il existe plusieurs modèles théoriques et empiriques décrivant le profil de dissolution. Dans la plupart des cas, le processus de dissolution du PA est la résultante de plusieurs phénomènes (e.g. diffusion, érosion). Les principaux modèles mathématiques sont résumés dans le Tableau 13 et présentés ci-après.

Tableau 13 : Exemples de modèles mathématiques pour décrire les profils de dissolution (Costa et Sousa Lobo, 2001)

Zero order	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
First order	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Second order	$Q_t / Q_\infty (Q_\infty - Q_t) K_2 t$
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_3 t$
Weibull	$\log[-\ln(1 - (Q_t / Q_\infty))] = b \times \log t - \log a$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Baker-Lonsdale	$(3/2)[1 - (-1(Q_t / Q_\infty))^{2/3}] - (Q_t / Q_\infty) = K t$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t / Q_\infty = K_k t^n$
Quadratic	$Q_t = 100(K_1 t^2 + K_2 t)$
Logistic	$Q_t = A / [1 + e^{-K(t-y)}]$
Gompertz	$Q_t = A e^{-e^{-K(t-y)}}$
Hopfenberg	$Q_t / Q_\infty = 1 - [1 - k_0 t / C_0 a_0]^n$

En ce qui concerne les modèles théoriques, quatre exemples sont présentés ici :

- Ordre 0 (Figure 29) : L'ordre zéro représente une vitesse de dissolution constante dans le temps. Le phénomène est rencontré pour de nombreuses formes à libération prolongée. Ce modèle est souvent adapté pour des formes

transdermiques ou osmotiques, des systèmes matriciels avec un PA peu soluble. Elle représente une cinétique idéale pour atteindre une action thérapeutique prolongée et sans fluctuation dans le temps.

- Ordre 1 : La fraction de dissolution est fonction du logarithme du temps, la vitesse de dissolution diminue en fonction du temps. Ce modèle est généralement observé avec une matrice poreuse pour un PA soluble dans l'eau.

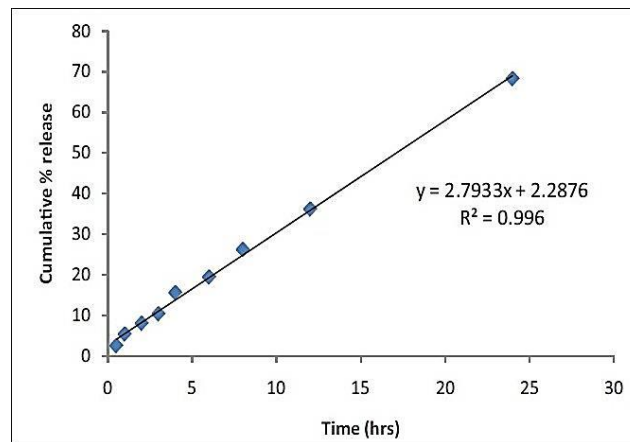


Figure 29 : Cinétiques d'Ordre 0 (Senthil et *al.*, 2010)

- Higuchi (Figure 30) : Le modèle est connu comme un modèle de diffusion. La dissolution suit la loi de Fick. La fraction de libération du PA évolue linéairement en fonction de la racine carrée du temps, ce phénomène est souvent rencontré pour les formes semi-solides et les matrices avec un PA soluble.

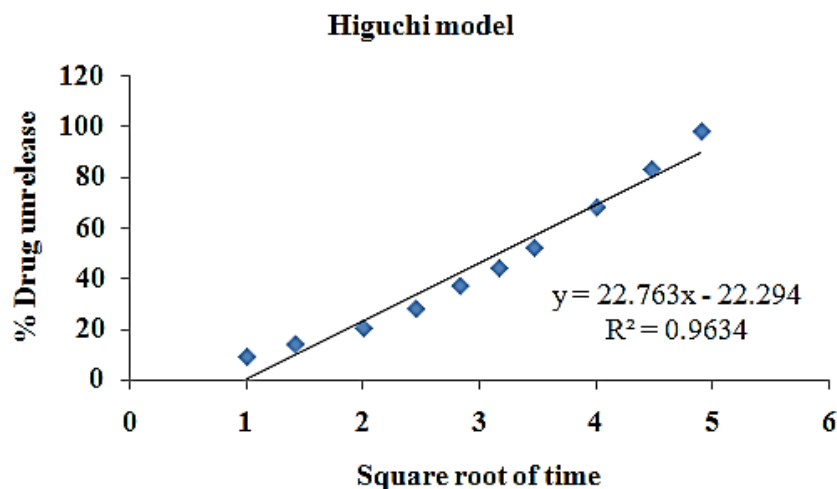


Figure 30 : Modélisation selon l'équation Higuchi (PharmaTutor, 2015)

- Hixson-Crowell (Figure 31) : Dans ce modèle, la racine cubique de la fraction du PA restant diminue linéairement avec le temps. Ce modèle est souvent adapté à la dissolution d'une poudre et aux formes multi-particulaires où la dissolution est due à l'érosion de la matrice.

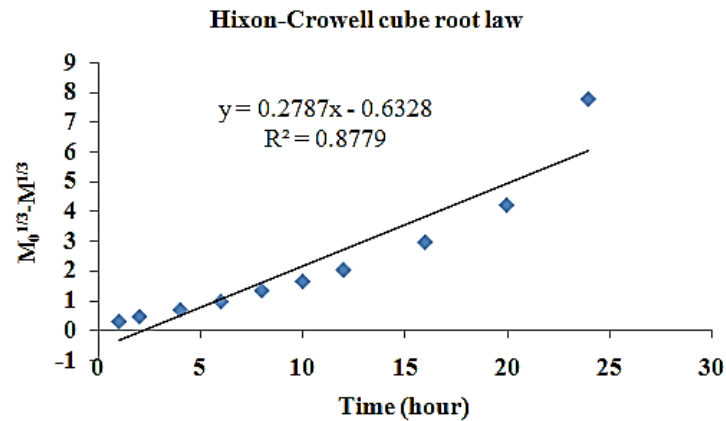


Figure 31 : Modélisation selon l'équation d'Hixson Crowell (PharmaTutor, 2015)

Pour des formes à libération immédiate ou prolongée et celles à base de polymère, la description du profil de dissolution avec un modèle théorique n'est pas toujours la plus appropriée. D'autres modèles empiriques sont alors plus pertinents. Deux exemples sont décrits ci-dessous.

- Weibull : Il s'agit du modèle empirique 'historique' et le plus utilisé, probablement car il prend en compte le temps de latence souvent observé en début de dissolution. Ce modèle, ayant un paramètre d'échelle du temps et un paramètre de forme, est adapté pour presque tous les types de profils.
- Korsmeyer-Peppas : Ce modèle est requis pour les mécanismes de libération des systèmes polymériques plus complexes. Ce modèle, reconnu comme la loi de puissance, permet de prendre en compte le mécanisme de libération avec la valeur de l'exposant n comme présentée au niveau de l'équation 1.

$$\text{Korsmeyer-Peppas : } Mt/M_0 = k_{kp} t^n$$

Mt/M_0 , fraction du PA libéré. k_{kp} , constante de libération

$n=1$: ordre 0 (érosion ou relaxation)

$n=0,5$: Higuchi (diffusion)

$0,5 < n < 1$: non fickienne (diffusion + érosion)

Équation 1

4.1.2.2. Pertinence du choix d'un modèle mathématique

Dans le cadre de la modélisation, la sélection d'un modèle mathématique est une étape essentielle non seulement pour une évaluation quantitative des mécanismes de dissolution, mais aussi pour une comparaison des profils de dissolution. Il existe plusieurs critères qui indiquent le niveau d'ajustement du modèle, par exemple, le coefficient de détermination (R^2), le coefficient de détermination ajusté (R^2_{adjusted}), pour n'en citer que quelques-uns. Pour les modèles contenant le même nombre de paramètres, R^2 peut indiquer de manière satisfaisante le niveau d'ajustement. Néanmoins, la valeur de R^2 a tendance à augmenter lorsque le nombre de paramètres augmente. En conséquence, pour les modèles ayant un nombre de paramètres différents, l'utilisation de R^2_{adjusted} est plus pertinente (Equation 2) (Zhang et *al.*, 2010).

$$R^2_{\text{adjusted}} = 1 - \frac{(n - 1)}{(n - p)}(1 - R^2)$$

Équation 2

n : nombre de prélèvements, p : nombre de paramètres, R^2 : coefficient de détermination

4.1.2.3. Comparaison des profils de dissolution

En effet, la comparaison des profils de dissolution est un travail délicat. D'un point de vue statistique, les valeurs moyennes de la fraction de dissolution doivent être comparées en prenant en compte leur variabilité. La dispersion est variable et due à différents facteurs ; elle regroupe la variabilité de la formule mais aussi celle inhérente au test de dissolution, et tend à diminuer en fin de la dissolution. De plus, les mécanismes de dissolution sont parfois différents. Dans ce contexte, trois approches sont proposées : méthodes statistiques, méthodes de modèle-indépendant et méthodes de modèle-dépendant (Dash et *al.*, 2010; O'Hara et *al.*, 1998; Yuksel et *al.*, 2000).

- Méthodes statistiques : Les méthodes statistiques sont basées sur l'approche ANOVA. L'avantage des méthodes ANOVA est que la variabilité entre les valeurs individuelles est prise en compte. Cependant, les méthodes ANOVA présentent de nombreuses limites. En effet, dans l'ANOVA à un facteur, les données de différentes formulations sont comparées à chaque temps de prélèvement, et cette analyse doit être répétée pour tous les points de prélèvement. De ce fait, l'ANOVA à un facteur ne prend pas en compte la corrélation entre les différents temps des

profils de dissolution. Si les profils ne sont pas de même nature, il est difficile, voire dangereux, d'interpréter les résultats. La méthode ANOVA à plusieurs facteurs paraît plus appropriée mais est beaucoup plus compliquée à mettre en œuvre. Néanmoins, aucune de ces méthodes n'est recommandée d'un point de vue réglementaire car une similitude statistique ne peut pas être considérée comme une équivalence pharmaceutique.

- Méthodes de modèle-indépendant : Elles sont plus faciles à mettre en œuvre. Ils permettent la réduction d'un profil de dissolution aux grandeurs ou paramètres listés dans le Tableau 14. De ce fait la variabilité n'est pas prise en compte et les paramètres ne peuvent pas représenter l'aspect du profil de dissolution. Il n'existe pas de critère statistique de comparaison des paramètres issus de deux profils de dissolution.

Tableau 14 : Grandeurs et paramètres des modèles indépendants

Méthode	Avantages	Limites
Efficiencie, MDT	Simple (temps qui correspond à 50 % de PA libéré)	Variabilité non prise en compte - Pas de critère de comparaison
Facteur de différence f_1	Réduction à 1 valeur Très facile à calculer	Variabilité non prise en compte - Supplanté par f_2
Facteur de similarité f_2	Réduction à 1 valeur Facile à calculer	Variabilité non prise en compte Non linéaire
Indices Rescigno	Basés sur les paramètres pharmacocinétiques	Difficiles à calculer Aucun critère de comparaison donné

Dans les modèles indépendants, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux facteurs de différence f_1 et de similarité f_2 (Moore JW, 1996) car ces paramètres sont cités et recommandés par l'EMA (Agence européenne des médicaments) et la FDA (Food and Drug Administration).

Le facteur de différence f_1 (équation 3) correspond à la somme des écarts à chaque temps exprimée comme un pourcentage de la somme des fractions libérées.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100$$

Équation 3

Rt : fraction de dissolution du produit de référence à l'instant t, **Tt** : fraction de dissolution du produit testé à l'instant t

Des prérequis sont à respecter afin que le résultat ne soit pas influencé par trop de points non représentatifs. Les points de prélèvements pour les deux profils doivent être identiques, avec trois points minimum en plus de celui du temps zéro. La variabilité doit être égale ou inférieure à 20 % pendant le début de la dissolution (par exemple, 15 min), puis inférieure à 10 % pour le reste. Comme le facteur f_2 , f_1 est sensible au nombre de prélèvements, un seul point de prélèvement après la libération 85 % doit être respecté.

Critère d'acceptation : 0-15. La valeur 0 correspond à des profils identiques et la valeur 15 à des profils différents de 10 %.

Le facteur de similarité f_2 (équation 4) est une transformation logarithmique de la moyenne des écarts au carré.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Équation 4

Rt : fraction de dissolution du produit de référence à l'instant t, **Tt** : fraction de dissolution du produit testé à l'instant t

Critère d'acceptation : 50-100. La valeur 100 correspond à des profils identiques et la valeur 50 à des profils différents de 10 %.

- **Modèles dépendants** : Ce type de méthode est fondé sur la modélisation préalable des profils de dissolution. Cette approche applique le modèle déterminé sur le profil du produit de référence à celui du produit test et permet ainsi de comparer des profils ayant des mécanismes de libération différents. Les étapes sont décrites ci-après :

- a) Déterminer le modèle mathématique adapté aux produits de référence, calculer les paramètres (vitesse de dissolution ...)
- b) Ajuster le modèle de référence aux produits testés, calculer les paramètres
- c) Comparer les valeurs des paramètres des produits testés à celles de référence par des méthodes ANOVA.

En résumé, l'intérêt de la modélisation des profils consiste non seulement à la compréhension du mécanisme de libération ou de dissolution du PA, mais aussi à l'exploitation des données avec les résultats de pharmacocinétique notamment pour une corrélation *in vitro-in vivo*. La comparaison des profils est importante et largement utilisée pour les galénistes et les analystes à diverses étapes de la recherche et du développement pharmaceutique (étude de formulation, étude de robustesse, dispense de bioéquivalence, transfert de méthode, ...) mais reste à ce jour encore peu exploitée (ou rarement communiquée) vis à vis des formes buccales.

4.2. Etude de la mucoadhésion

Elles rassemblent des méthodes *in vitro* et *in vivo*. Les premières sont relativement faciles à mettre en œuvre et moins coûteuses alors que les secondes visent à prédire de manière pertinente un comportement en conditions réelles d'utilisation chez le patient.

4.2.1. Etude *in vitro*

Les techniques *in vitro* permettent ainsi de discriminer des formulations et de sélectionner les plus pertinentes pour la poursuite des essais *in vivo*.

Une détermination directe de la capacité de mucoadhésion regroupe la mesure de la force de détachement et le temps nécessaire pour un détachement complet (ou le pourcentage de polymère restant sur la surface de la muqueuse) (Batchelor et *al.*, 2002; Belgamwar et *al.*, 2009; Le Ray et *al.*, 1999). Tandis que les méthodes indirectes s'intéressent à la mesure des interactions entre le polymère et le gel de mucus ou la mucine, on peut citer les techniques rhéologiques ou spectroscopiques (Khutoryanskiy, 2011).

4.2.1.1. Méthodes de détachement

Le test de traction est une des méthodes les plus utilisées. Elles reposent toutes sur le même principe. La forme mucoadhésive à tester est placée sur un support immobile relié à un appareil de mesure de force. Le tissu ou la substance biologique est fixé soit sur le support mobile soit sur celui immobile soit sur les deux. Après un temps de contact prédéfini par l'expérimentateur, le support mobile sera éloigné progressivement de la forme. Cela permet d'obtenir une courbe de contrainte en fonction de la distance de l'allongement. La majorité des systèmes sont verticaux et adaptés du texturomètre ou dynamomètre (Figure 32).

Dans cette approche, la force mesurée apporte de multiples paramètres caractéristiques de l'interaction : la force maximale d'adhésion, le travail total fourni à l'adhésion (Baloğlu et *al.*, 2003). Il existe plusieurs paramètres extérieurs qui peuvent impacter les résultats : par exemple la force appliquée pour créer le contact initial avec le tissu, la vitesse de traction, et l'environnement du test (e.g. présence de liquide, pH de la solution et la température). Tous ces facteurs expérimentaux doivent être maîtrisés attentivement.

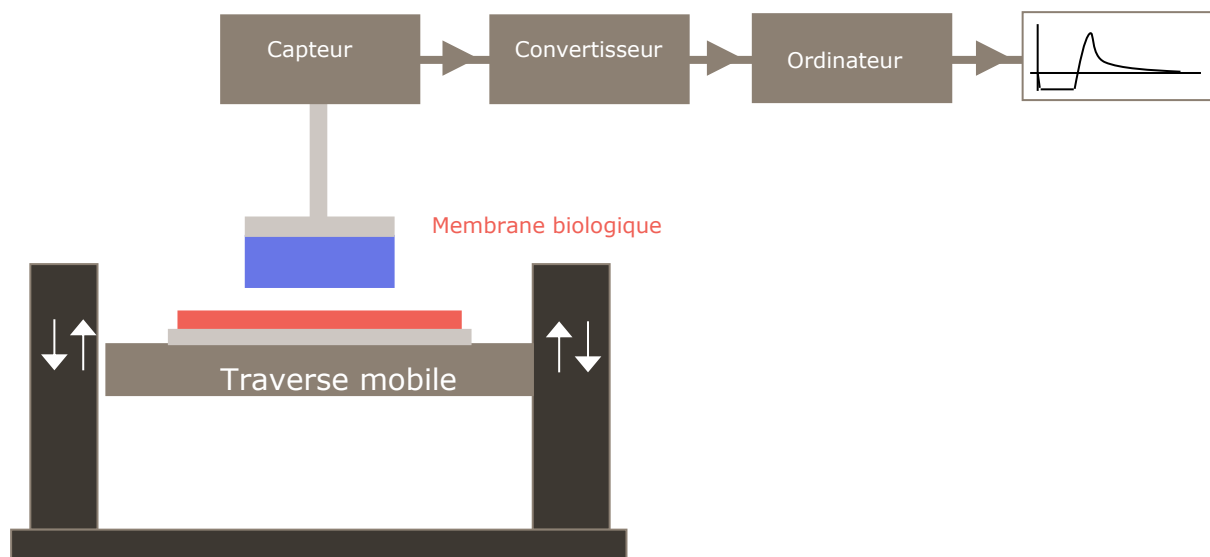


Figure 32 : Dispositif expérimental d'évaluation de la mucoadhésion par mesure de la force de détachement (Jacques et Buri, 1997)

Si ces méthodes reproduisent en partie des phénomènes physiques présents *in vivo*, il convient de souligner qu'une traction est relativement rare car le cisaillement joue un rôle plus important *in vivo* (Edsman et Hägerström, 2005). Néanmoins, ce test fournit des informations sur les capacités relatives à la mucoadhésion des polymères et permet de les classer les uns par rapport aux autres (Hägerström et Edsman, 2001).

D'autres auteurs utilisent un cylindre rotatif pour évaluer la résistance des formes (solides ou semisolides) sur la muqueuse sous cisaillement (Figure 33). Le dispositif employé était un appareil de dissolution (USP VI) : Sur le cylindre, était fixée une muqueuse sur laquelle étaient déposés des comprimés mucoadhésifs. Le paramètre mesuré était le temps de détachement. La désintégration et/ou une érosion de comprimés était observée macroscopiquement (Grabovac et *al.*, 2005; Kafedjiiski et *al.*, 2007). Les auteurs ont obtenu une bonne corrélation entre cette méthode et celle de traction en utilisant divers polymères mucoadhésifs.

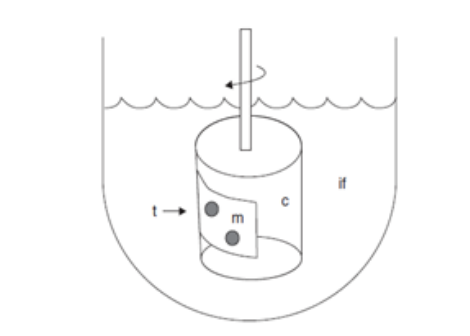


Figure 33 : Schéma de montage de la méthode du cylindre rotatif. c : cylindre rotatif ; if : fluide intestinale ; m : muqueuse porcine ; t : tablet

Les essais à flux continu consistent à quantifier la résistance d'un polymère sur la surface muqueuse soumis à un flux continu (Figure 34) (Le Ray et *al.*, 1999; Rao et Buri, 1989). Des sphères en verre sont d'abord enrobées par les polymères à tester. Celles-ci sont ensuite déposées sur la muqueuse, puis un flux de solution tampon est créé sur la muqueuse. Le pourcentage des sphères restant sur la muqueuse est alors calculé. Une autre possibilité repose sur la mesure de la concentration du principe actif ou du polymère recueilli dans le collecteur (Nielsen et *al.*, 1998).

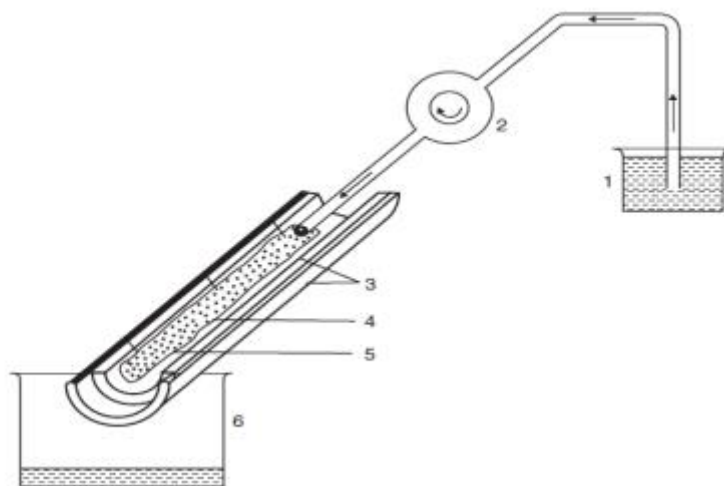


Figure 34 : Schéma illustrant le montage de l'appareil utilisé par Rao et Buri (Rao et Buri, 1989). 1. Solution tampon, 2. Pompe, 3. Support, 4. Muqueuse, 5. Sphères de polymères, 6. Collecteur.

Dans ces études, la membrane biologique utilisée pour étudier la mucoadhésion est souvent la muqueuse buccale isolée d'un animal pour simuler l'environnement physiologique. Néanmoins, à cause des résultats non reproductibles et des problèmes de conservation, l'utilisation des substrats alternatifs peut être intéressante. Des surfaces à base de mucine sous forme d'hydrogels, de comprimés ou de films ont été ainsi développées et ces techniques ont particulièrement attiré notre attention par leur facilité de mise en œuvre et leur capacité à rapidement discriminer les polymères entre eux (Jones et *al.*, 2009; Sandri et *al.*, 2011).

4.2.1.2. Méthodes rhéologiques

Afin de mieux comprendre le phénomène de mucoadhésion, Peppas et Huang ont souligné l'importance de la nature des interactions entre le polymère bioadhésif et la mucine (Peppas et Huang, 2004). Dans ces études, la mucine gastrique du porc commercialisée peut être facilement dispersée dans l'eau pour étudier l'interaction polymère-mucine. Les

changements d'énergie de liaison chimique ou physique, issus de l'interaction mucus-polymère peuvent être mis en évidence par des modifications en énergie mécanique.

Toute déformation (cisaillement) d'une solution de polymère s'accompagne d'une suite complexe de remises en ordre moléculaire, à court et long terme. La rhéologie s'intéresse à ces arrangements coopératifs. En comparant la rhéologie des solutions de polymère mucoadhésif, de mucine et de leur mélange, le lien adhésif peut être quantifié (Hassan et Gallo, 1990). Ce travail entraîne des modifications dans l'arrangement des macromolécules qui sont à la base de changement de viscosité (équation 5).

Équation 5 $\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b$

η_t représente la viscosité de la solution contenant le polymère et la mucine, η_m et η_p sont les viscosités respectives de la mucine et du polymère, enfin η_b est la viscosité qui rend compte de l'interaction entre le polymère et la mucine.

Une autre approche rhéologique consiste à évaluer les propriétés viscoélastiques dynamiques du système. En appliquant des contraintes de cisaillement croissantes à un même échantillon (fréquence et température constantes), il est possible de mesurer une grandeur caractéristique de ce dernier : le module complexe de cisaillement G^* . À partir de ce paramètre, deux constantes G' et G'' peuvent être calculées. Le module de conservation, G' , rend compte de la composante élastique du système (retour à la configuration initiale après interruption de la contrainte). Le module de perte, G'' , rend compte de la réponse visqueuse du système. Il est démontré que l'ajout de la mucine entraîne une augmentation des valeurs de G' et G'' (Madsen et *al.*, 1998b; Tamburic et Craig, 1997).

4.2.1.3. Autres méthodes

Sous certaines conditions, le comportement des glycoprotéines du mucus traduit une interaction entre ce dernier et un polymère. Le marquage des glycoprotéines permet de suivre des changements de microviscosité par spectroscopie électronique de spin (Hägerström et *al.*, 2005). De même, les changements de la force ionique ou du pH sont observables en résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{13}C . Cela permet de caractériser un lien mucoadhésif d'une façon indirecte (Patel et *al.*, 2003). D'autres paramètres tels que le potentiel zêta et l'énergie de surface, peuvent aussi indiquer les interactions mucine-polymère (Takeuchi et *al.*, 2005). Un instrument, constitué d'une microbalance précise et sensible mesure l'angle de contact et la tension superficielle (Chickering et *al.*, 1995). Généralement, un grand angle de contact favorise l'adhérence de deux surfaces.

4.2.2. Etude *in vivo*

Par rapport aux études *in vitro*, les essais *in vivo* sont moins développés du fait de leur coût et des problèmes éthiques qu'ils suscitent. Néanmoins, ces derniers procurent des informations essentielles et correspondent à une étape cruciale dans le développement d'une forme mucoadhésive. Les principales méthodes historiques dont certaines non-invasives sont citées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Méthodes d'évaluation *in vivo*

	Principe de la méthode
γ scintigraphie	Rayonnement γ utilisé pour déterminer les temps de rétention de polymères mucoadhésifs
Autoradiographie	Marquage de formes pharmaceutiques et administration à l'animal Mesure de la quantité effectivement adhésive de polymères
Observation visuelle	Sans sacrifice pour les muqueuses facilement accessibles Adaptée pour des formes solides Evaluation directe mais peu précise

La γ -scintigraphie est une technique biomédicale non invasive qui permet de suivre le cheminement dans l'organisme d'une formulation marquée par un émetteur de rayonnement γ . Cette technique a été appliquée pour déterminer les temps de rétention des polymères marqués au technétium 99 (99Tc) dans l'organisme (Christensen et *al.*, 1985).

Une autre méthode utilise l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Albrecht et *al.*, 2006). Kremser et al, ont employé cette technique afin de déterminer le temps de présence de la forme dans le tractus gastro-intestinal (Kremser et *al.*, 2008). Dans leur travail, des ions Gd^{3+} paramagnétiques conjugués à l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) étaient incorporés dans des capsules d'Eudragit® pour localiser la forme. De plus, le polymère thiolé de polycarbophile a été marqué par le diacétate de fluorescéine, ce qui permet non seulement la visualisation de la forme mais aussi un dosage du polymère sur la muqueuse intestinale.

Le marquage de formes pharmaceutiques permet d'observer par autoradiographie la présence et la localisation précise de ces dernières après administration chez l'animal. Le marquage peut être réalisé soit sur les principes actifs soit sur les polymères mucoadhésifs. Néanmoins, il convient de s'assurer que ce marquage ne modifie pas les propriétés de la molécule ou du polymère.

En ce qui concerne les méthodes d'observation directe, Patel et Poddar ont utilisé des lapins anesthésiés pour la mesure du temps de séjour de la forme *in vivo* (Patel et Poddar, 2009). Le patch mucoadhésif a été placé sur la muqueuse buccale entre la joue et la gencive

dans la région de la canine supérieure et délicatement pressé pendant environ 30 secondes. Le temps nécessaire à l'érosion complète du patch a été noté. La répétition de l'application du patch mucoadhésif utilisant le même animal a été autorisée après une période de cinq jours de repos.

Ameye et *al.* ont étudié la mucoadhésion *in vivo* chez sept chiens mâles castrés. Les chiens étaient conscients pendant la période de l'essai. Un comprimé a été placé sur la gencive au-dessus de la canine supérieure droite. L'adhésion dans le temps a été suivie visuellement (Ameye et *al.*, 2005).

Nafee et collaborateurs ont utilisé quatre hommes volontaires sains âgés de 25 à 50 ans (Nafee et *al.*, 2004b). Les volontaires ont été invités à surveiller la facilité avec laquelle le système a adhéré à la muqueuse et à noter toute tendance au détachement. Le temps nécessaire pour l'érosion complète du comprimé était en même temps suivi en observant attentivement le polymère résiduel sur la muqueuse. La répétition d'application des comprimés mucoadhésifs a été autorisée après une période de deux jours pour le même volontaire.

4.3. Etude de la perméabilité transbuccale

Généralement, dans la phase précoce du développement de la formulation où de nombreux essais sont effectués lors du « screening », des études *in vivo* ne sont pas nécessaires à ce stade. Dans cette situation, l'évaluation de la perméation de la molécule administrée à travers une membrane biologique permet de prédire son absorption vers la circulation systémique chez l'homme.

Plusieurs méthodes *in vitro* et *ex vivo* ont été développées pour évaluer la perméabilité transbuccale de diverses molécules. D'une façon générale, il existe deux modèles expérimentaux : méthodes *ex vivo* à base du tissu animal et celles *in vitro* à base de culture cellulaire (Figure 35). Le principe est néanmoins le même, il s'agit d'utiliser un système de diffusion sous des conditions contrôlées (température, pH), dans lequel la solution du PA ou la forme est appliquée à la surface biologique. Des prélèvements à intervalle prédéfini sont effectués de l'autre côté de la membrane (compartiment receveur), le PA est ensuite dosé afin de tracer le profil de passage en fonction du temps.

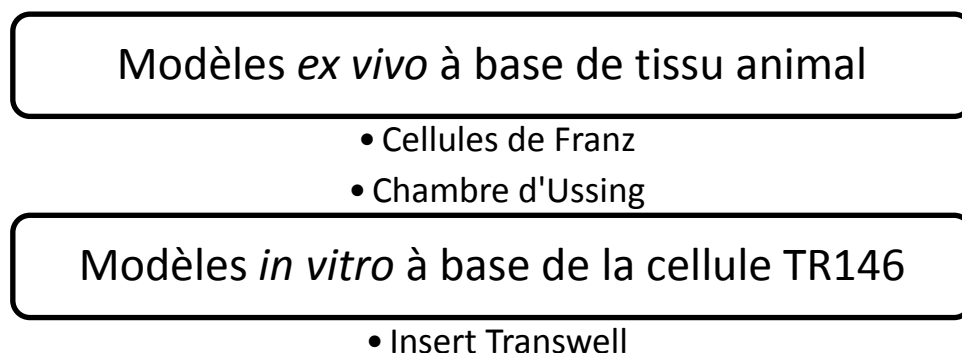


Figure 35 : Principales méthodes d'évaluation de la perméabilité transbuccale

4.3.1. Méthodes utilisant une muqueuse animale

Dans la plupart des cas, il s'agit de prélever la muqueuse buccale immédiatement après le sacrifice de l'animal. Le tissu conjonctif est ensuite enlevé avant la mise en conservation dans une solution de tampon Krebs à 4°C par exemple jusqu'au jour de l'utilisation. Les tissus les plus fréquemment utilisés sont issus de diverses espèces animales comme le porc, le lapin, le chien, le singe, le hamster ou le rat. Leurs caractéristiques par rapport à celle de l'homme sont synthétisées dans le Tableau 16. En raison de sa similarité avec celle de l'homme, la muqueuse buccale du porc est la plus utilisée (Kulkarni et *al.*,

2010). Ce modèle présente beaucoup d'avantages car le tissu est relativement facile à obtenir ainsi l'étude nécessite un coût beaucoup moins élevé que celui *in vivo*. Néanmoins, son prélèvement et sa conservation restent délicats à maîtriser. Comme les résultats sont fortement dépendants de l'épaisseur de la muqueuse, il est parfois difficile de comparer des études provenant de différents travaux de recherche (Kulkarni et *al.*, 2009).

Concernant l'appareillage, en plus de la cellule de Franz qui a été déjà présentée, une autre alternative est celle de la chambre d'Ussing. Il s'agit d'un système de diffusion horizontale, composé de deux compartiments, entre lesquels est placé le tissu épithélial (Nicolazzo et Finnin, 2008). A la fin des essais, les propriétés biologiques du tissu, sa viabilité et son intégrité sont évaluées par diverses méthodes : l'examen histologique, l'essai MTT (Nicolazzo et *al.*, 2003), le niveau ATP ainsi que le marqueur à base de dextran (Kulkarni et *al.*, 2010).

Tableau 16 : Comparaison de la muqueuse buccale chez différents animaux (Patel et *al.*, 2012)

Modèle	Structure du tissu	Epaisseur de la muqueuse buccale (µm)
Homme	Non kératinisé	580 ± 90
Chien	Non kératinisé	126 ± 20
Hamster	Kératinisé	115,3 ± 11.5
Porc	Non kératinisé	772 ± 150
Lapin	Partiellement kératinisé	600
Rat	Kératinisé	Non disponible
Singe	Non kératinisé	271 ± 50

4.3.2. Méthodes à base de culture cellulaire

En raison des inconvénients associés à l'utilisation de la muqueuse animale, les membranes biologiques à base de culture cellulaire permettent de réaliser des essais de type « screening ». Ce modèle *in vitro* est largement accepté et développé chez les industriels car il représente un outil rapide et reproductible. Il évalue non seulement le comportement de perméation notamment à l'aide du système Transwell®, mais aussi de mesurer la cytotoxicité de la substance testée afin d'estimer la tolérance sur la muqueuse buccale.

Nous nous sommes intéressés à la lignée cellulaire TR146, qui provient d'une métastase d'un carcinome buccal chez l'homme (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/>, 2013). Les cellules TR146 possèdent une morphologie similaire aux cellules physiologiques,

et expriment des marqueurs de différenciation spécifiques (Mørck Nielsen et Rømer Rassing, 2000). De nombreuses études de perméabilité sont réalisées sur ce modèle (Sander et *al.*, 2013; Xue et *al.*, 2012), notamment celles les comparant aux essais *ex vivo* sur muqueuse de porc (De Caro et *al.*, 2008; Holm et *al.*, 2013). Il est à noter que l'épaisseur de l'épithélium reconstitué par les cellules TR146 est d'environ 100 μm tandis que celle du porc est de 500-800 μm . De plus, le contenu lipodique entre les couches épithéliales et les connections intercellulaires ne sont pas les mêmes (Jacobsen et *al.*, 1999b). Malgré ces différences, une bonne corrélation entre les résultats permet de valider cette méthode *in vitro*.

Comme dans les études utilisant la muqueuse, une évaluation de la viabilité des cellules reste nécessaire à la fin des essais pour valider les résultats. Plusieurs exemples sont cités dans le Tableau 17. Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont le MTT et MTS/PMS, qui mesurent l'activité mitochondriale des cellules.

Tableau 17 : Exemples des essais de cytotoxicité sur les cellules TR146

Substance testée	Méthode	Référence
Promoteurs d'absorption chimiques	MTT	(Xue et <i>al.</i> , 2012)
Bêta-cyclodextrine	MTT LDH extracellulaire IL-1 alpha Examen histologique	(Boulmedarat et <i>al.</i> , 2005)
Galantamine	MTT Examen histologique	(De Caro et <i>al.</i> , 2008)
Complexes de cyclodextrines de miconazole, econazole et clotrimazole	MTS/PMS	(Jacobsen et <i>al.</i> , 1999a)
Formulation liposome	MTS/PMS	(Smistad et <i>al.</i> , 2007)
Glycocholate	MTS/PMS Rétention Rouge Neutre ATP intracellulaire LDH intracellulaire	(Eirheim et <i>al.</i> , 2004)
Metformine chitosan disc	MTS/PMS	(Sander et <i>al.</i> , 2013)
Beta-antagonistes	MTS/PMS	(Nielsen et Rassing, 2000)

5. Conclusion du chapitre 2

La muqueuse buccale est reconnue depuis longtemps comme un site intéressant pour l'administration des médicaments notamment en cas d'urgence. Dans ce chapitre, nous avons d'abord présenté les caractéristiques anatomiques de la muqueuse buccale ainsi que l'environnement physiologique notamment la sécrétion salivaire. Malgré sa fonction de protection, la muqueuse buccale présente une perméabilité relativement élevée et une vascularisation importante qui offre une plateforme d'absorption intéressante des médicaments. Néanmoins, le temps de présence des médicaments appliqués sur la muqueuse buccale peut être influencé par le flux salivaire ainsi que la mastication des aliments. Cela va impacter l'absorption du PA et sa biodisponibilité.

Face à ces propriétés inhérentes, ont été analysés et soulignés dans ce travail les critères essentiels qui peuvent potentiellement modifier l'absorption transbuccale d'un médicament comme :

- Les facteurs physiologiques comprenant l'épaisseur de la muqueuse, la sécrétion salivaire, les enzymes présents dans la cavité buccale.
- Les facteurs physicochimiques de la molécule administrée comprenant la masse molaire, le pKa, la solubilité et la lipophilie.
- Les facteurs de la formulation qui peuvent être la présence de promoteur d'absorption, de polymère mucoadhésif, de solubilisant voire de nanoparticules.

De nombreux polymères ont été cités ayant des propriétés mucoadhésives marquées dont certains dits de deuxième génération qui assurent un ciblage spécifique. Néanmoins, seuls les polymères de première génération présentent un recul suffisant vis-à-vis de leur innocuité comme la gomme xanthane qui est fréquemment incorporée dans des formes locales.

Les principales méthodes d'évaluations ont ensuite été présentées dans le développement d'une formulation destinée à la voie buccale avec :

- Les essais de dissolution, qui permettent de décrire les comportements tels que la vitesse de dissolution, la cinétique de dissolution notamment en utilisant les modèles mathématiques. Cela permet aussi d'étudier l'influence de la formulation.
- Etudes de la mucoadhésion *in vitro* et *in vivo*, qui permettent d'évaluer la capacité mucoadhésive et le temps de résidence de la forme.

- Etude de la perméabilité. Deux méthodes existent : une à base du tissu animal et l'autre à base de la culture cellulaire. Elle permet aussi d'étudier la cytotoxicité de la formulation.

Dans le chapitre suivant, nous nous focaliserons sur le développement d'une forme à base d'hydrogel thermogélifiant pour l'administration de salbutamol. En effet, l'ajout d'un polymère thermosensible a été retenu pour renforcer la persistance de la forme en complément de la mucoadhésion.

Chapitre 3 : Développement d'une forme originale à base d'hydrogel thermosensible

1. Hydrogel et ses applications

1.1. Généralités

Les hydrogels sont des réseaux réticulés, tridimensionnels de polymères hydrophiles, qui ont la capacité d'absorber de très grande quantité d'eau ou de fluide biologique (Patel et Mequanint, 2011). Ces matériaux mous, présente une forme physique stable, avec une stabilité chimique et biologique. Ils sont souvent très perméables aux petites ou grandes molécules solubles dans l'eau. A partir de ces propriétés intéressantes, les hydrogels sont donc largement utilisés pour des applications biomédicales telles que la délivrance de médicament, la formation de matrice pour la régénération et la réparation de tissus, les implants et les lentilles de contact souples, pour ne citer que quelques exemples.

Dans les années 60, des chercheurs tchèques ont synthétisé les premiers hydrogels par copolymérisation du 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) avec l'éthylène diméthacrylate (EDMA) pour la fabrication de lentilles de contact (Wichterle et Lím, 1960). Depuis, l'utilisation de ces gels hydrophiles et biocompatibles s'est largement développée. Les domaines d'applications sont de plus en plus nombreux au cours des dernières décennies soulignant l'intérêt suscité par cette forme innovante (Figure 36) (Van Vlierberghe et *al.*, 2011).

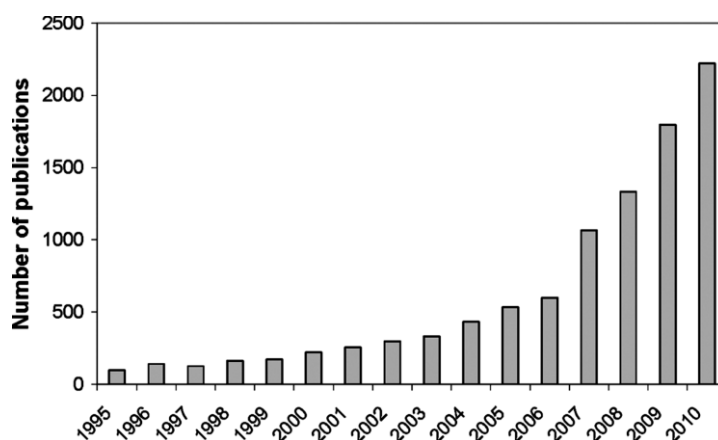


Figure 36 : Ensemble des publications relatives aux hydrogels entre 1995 et 2010 (Van Vlierberghe et *al.*, 2011)

Les hydrogels constitués de polymères hydrophiles, sont hydratés ou gonflent dans un environnement aqueux. Le réseau tridimensionnel peut être formé par différents mécanismes :

- la réticulation chimique par des liaisons covalentes produites par la réaction d'un ou plusieurs co-monomères,
- la réticulation par l'enchevêtrement physique des chaînes polymériques,
- l'association de liaisons comprenant des liens hydrogènes, ioniques ou hydrophobiques, ou des interactions Van der Waals entre les chaînes,
- les cristallites liant deux ou plusieurs chaînes macromoléculaires.

Les hydrogels peuvent être classés dans différentes catégories en fonction de différents critères (Patel et Mequanint, 2011) :

- La méthode de préparation : homopolymères, copolymères
- La source du polymère : naturel, synthétique
- La nature de la réticulation : chimique, physique
- La charge du polymère : non ionique, cationique, anionique
- Le devenir du polymère *in vivo* : biodégradable, non biodégradable

Selon la méthode de préparation, il est possible d'obtenir soit des homopolymères soit des copolymères. Le critère charge globale permet une classification de trois sous-groupes : neutre, anionique, cationique, en fonction de la nature des blocs de polymères composant l'hydrogel. Généralement, les hydrogels issus de polymères naturels présentent des propriétés mécaniques moins importantes par rapport à ceux de synthèse, mais offrent une plus grande biocompatibilité ou biodégradabilité.

Néanmoins, la classification la plus courante distingue deux grandes familles : les hydrogels chimiques et les hydrogels physiques. La différence entre ces deux familles réside dans la nature des liaisons qui constituent les réticulations :

D'une part, les hydrogels chimiques ou dits « permanents », possèdent les réseaux réticulés qui sont formés par des liaisons covalentes. Ils sont préparés soit par la méthode de copolymérisation de monomères par les agents de réticulation (souvent toxique), soit par l'enchevêtrement des fragments de polymères par diverses méthodes (agents de réticulation, méthodes d'irradiation tels que l'UV, les microondes).

D'autre part, les hydrogels physiques ou dits « réversibles » sont formés par l'enchevêtrement de polymère par des forces secondaires réversibles. Celles-ci peuvent être de type liaisons hydrogène, Van der Waals, ioniques, ou hydrophobes. La réticulation d'un hydrogel physique peut être provoquée par les conditions physiques ou chimiques telles que

la température, la contrainte mécanique, le pH ou la force ionique. Dans la préparation des hydrogels physiques, la procédure est en général plus simple sans intervention d'agent réticulant.

Au sein de ces hydrogels, nous sommes intéressés particulièrement à l'hydrogel de type physique. Le poloxamère 407, que nous serons amenés à décrire plus spécifiquement par la suite, est un exemple de ce type d'hydrogel, sa gélification est liée au changement de la température de l'environnement.

Par ailleurs, les hydrogels peuvent être distingués par les différentes formes physiques selon les applications, comme par exemple :

- Liquide (hydrogel type sol-gel ou « intelligent »)
- Semi-solides (e.g. gels pour les applications topiques)
- Solide mou (e.g. lentilles de contact)
- Solide (e.g. comprimés matriciels, comprimés enrobés, microparticules)
- Sous forme de membrane (e.g. film, patch, pansement hydrogel)
- Nanoparticules

1.2. Application d'hydrogel dans le système de délivrance de médicaments

D'un point de vue chimique, la grande absorption d'eau par l'hydrogel est liée à la présence de groupes hydrophiles dans la structure du polymère, tels que des groupements hydroxyde (-OH), carboxyle (-COOH), amide (-CONH- ou -CONH₂) ou sulfonique (-SO₃H). La grande quantité d'eau qui les compose confère aux hydrogels des propriétés semblables à celles des tissus vivants, et les rend donc très intéressants pour des applications pharmaceutiques et biomédicales. Les trois principales applications sont résumées dans le Figure 37.

Système de délivrance de médicament	Immobilisation cellulaire	Ingénierie de tissu
• Haute perméabilité du PA • Libération contrôlée du PA	• Croissance des cellules dans la matrice • Par l'adsorption, la capture ou l'encapsulation	• Scaffolds riche en eau • Délivrance des cellules

Figure 37 : Principales applications d'hydrogel dans le secteur pharmaceutique (adapté de (Patel et Mequanint, 2011))

Parmi les applications d'hydrogel, les systèmes de délivrance de médicaments sont devenus un domaine de recherche majeur (Hoare et Kohane, 2008; Peppas et *al.*, 2000). Les hydrogels forment une matrice qui protège le PA de la dégradation et de l'inactivation : sa forte hydrophilie favorise l'incorporation de molécules hydrosolubles et lui confère un caractère biocompatible ainsi qu'une libération contrôlée.

De nombreux travaux de type revue bibliographique ont montré l'utilisation du système d'hydrogel en tant que système de libération de médicaments (Hoare et Kohane, 2008; Lin et Metters, 2006; Peppas et *al.*, 2000). Afin de développer un système efficace d'hydrogel pour la délivrance de médicaments, une maîtrise des variables qui sont responsables des caractéristiques du système, est nécessaire. Le choix du matériau et du réseau de l'hydrogel va déterminer la libération du médicament à partir de la matrice. Les principaux critères à prendre en compte dans la formulation et le développement de l'hydrogel avant son utilisation sont illustrés dans la Figure 38.

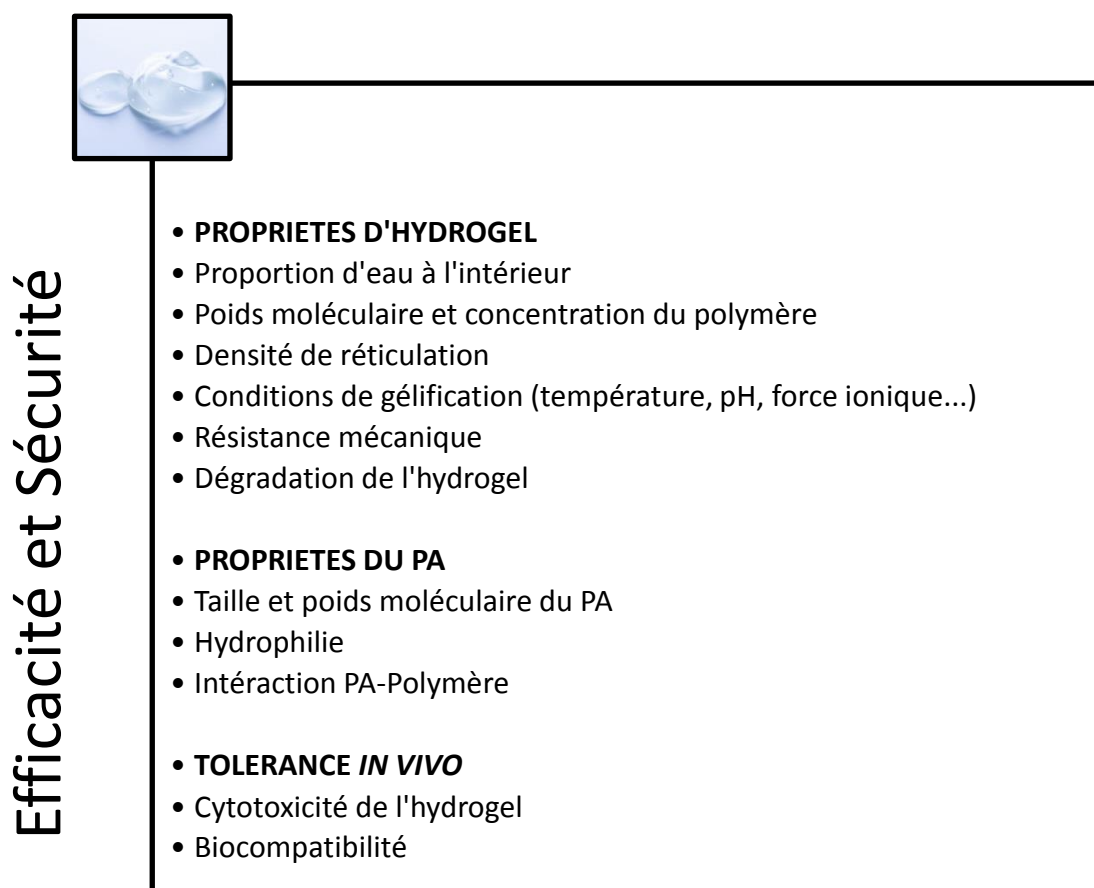


Figure 38 : Eléments clés pour développer un hydrogel utilisé pour une libération contrôlée de médicament

Généralement, la vitesse et les mécanismes de transport ou de relargage du PA peuvent être contrôlés en modifiant des facteurs tels que la composition du polymère, la densité de réticulation et le contenu en eau. D'abord, au niveau des propriétés physico-chimiques du système d'hydrogel, la proportion en eau à l'intérieur de la structure est importante. Elle est caractérisée par trois paramètres critiques, à savoir la fraction volumique de polymère à l'état gonflé, le poids moléculaire moyen entre les réticulations ainsi que la taille des mailles du réseau. Elle détermine également leurs propriétés mécaniques ou de surface, leur perméabilité, et leur biocompatibilité. Plusieurs types d'hydrogels mucoadhésifs ont été développés. Ils permettent d'augmenter la concentration locale en médicament et d'améliorer sa délivrance à travers par exemple des muqueuses (Peppas et Sahlin, 1996), comme nous en avons déjà discuté dans le chapitre 2. La capacité de transition de phase de certains hydrogels est également très attractive pour les applications de libération contrôlée. Par exemple, dans le cas des hydrogels sensibles au pH, lors de l'administration dans l'organisme, son gonflement est minimal à pH neutre et le PA reste à l'intérieur de la forme pharmaceutique. Néanmoins, dans l'estomac à pH acide, le gel est formé par ionisation du polymère, le PA est alors libéré.

En outre, des molécules de différentes tailles ou d'hydrophilie variable peuvent diffuser vers l'extérieur du réseau d'hydrogel par l'intermédiaire de différents mécanismes. La tolérance *in vivo* est bien évidemment un facteur essentiel à prendre en compte sur un plan local ou général. Cela peut être étudié *in vitro* par les essais de cytotoxicité.

En résumé, il est nécessaire d'adapter la composition du système d'hydrogel en fonction des besoins de la forme à libération contrôlée à développer. En jouant sur les propriétés physicochimiques du polymère, il est possible d'ajuster le comportement de diffusion du PA. En particulier, l'utilisation des hydrogels de type « Sol-Gel » est très intéressante pour créer des systèmes de libération auto-formée *in vivo*, comme cela est décrit dans la partie suivante.

2. Hydrogels de transition de phase « Sol-Gel »

Les hydrogels qui peuvent réagir à des changements d'environnement par une transition de phase sont souvent nommés hydrogels « intelligent » ou de transition de phase « Sol-Gel ». Utilisés en tant que système de délivrance de médicaments, ils présentent une grande pertinence (Figure 39).

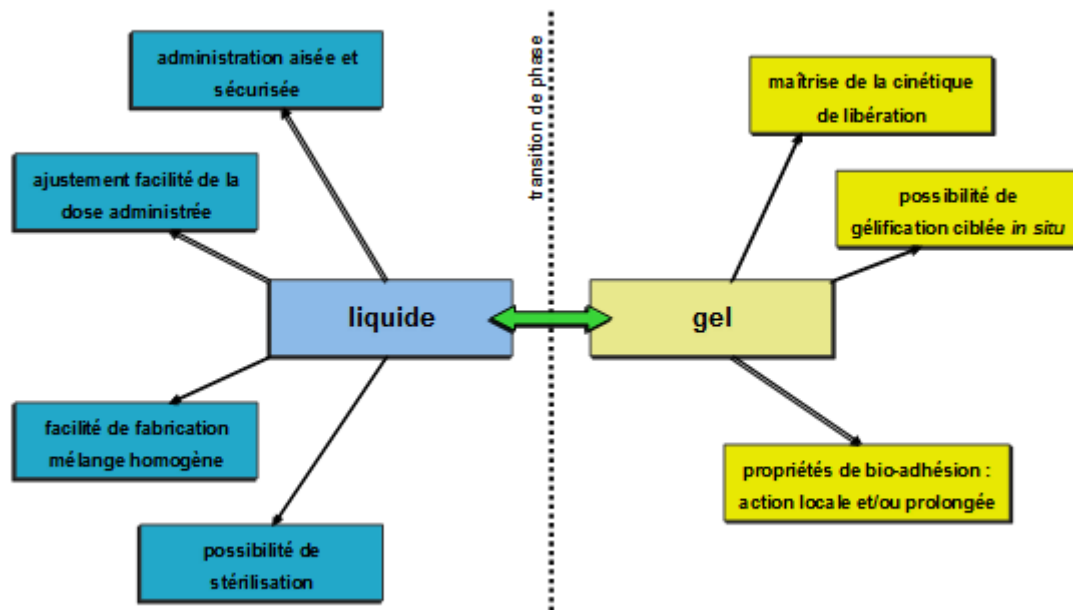


Figure 39 : Avantages et enjeux des hydrogels « Sol-Gel »

Préparer et administrer sous forme liquide, cette plateforme présente de nombreux avantages comme :

- Administration aisée et sécurisée, surtout en pédiatrie (valable aussi pour la gériatrie et autres situations cliniques où il peut y avoir un danger ou une difficulté à déglutir une forme solide (comprimé/gélule)).
- Ajustement de la dose administrée facilité en fonction du poids et du contexte clinique.
- Facilité de fabrication.
- Possibilité de fabriquer des solutions stériles par filtration permettant d'éviter le recours à des conservateurs anti-microbiens,...

Une fois sous forme gélifiée, de nouvelles fonctionnalités apparaissent comme :

- Constitution d'une structure matricielle permettant d'envisager une maîtrise de la cinétique de libération (libération retardée et/ou prolongée)
- Possibilité de développer une gélification ciblée à un niveau du tractus digestif différent de l'estomac
- Apparition dans certains cas de propriétés de bio-adhésion rendant possible une action localisée voire, une prolongation du temps de séjour au niveau du site d'administration

Il existe plusieurs types de stimuli extérieurs qui peuvent être à l'origine de la transition de phase sol-gel ou de modifications relativement importantes de structure et de propriétés telles que le gonflement, la texture ou encore la viscosité. Ils sont en général classés en trois types : stimuli physiques, chimiques et biochimiques (Figure 40).

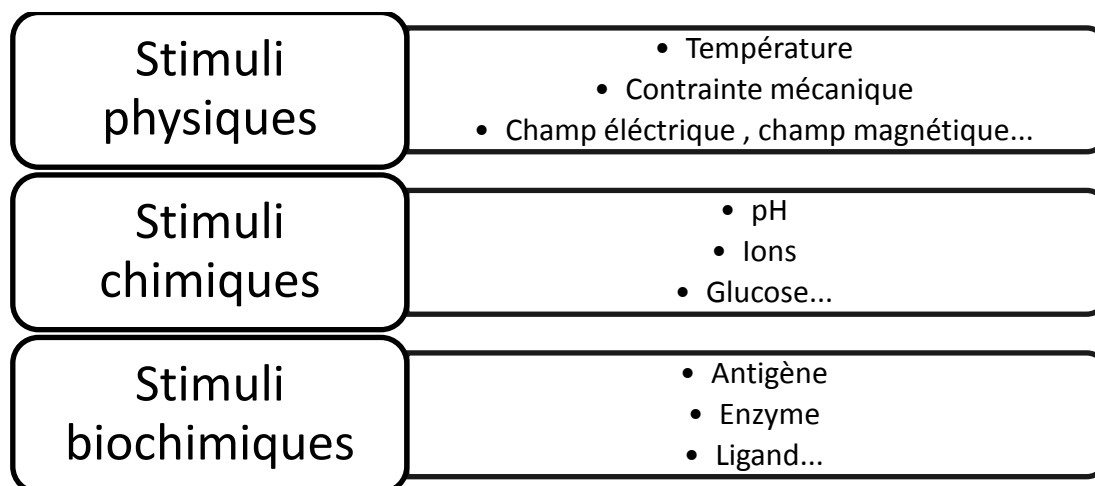


Figure 40 : Les principaux stimuli extérieurs susceptibles de déclencher une transition de phase d'hydrogel (Qiu et Park, 2001)

Généralement, les polymères qui sont sensibles au changement de pH, possèdent des groupements acides ou basiques. En acceptant ou donnant des protons en réponse à un changement du pH environnemental, le degré d'ionisation du polymère varie, ainsi l'état de gonflement du polymère est modifié. C'est par exemple le cas du Carbopol®, qui a déjà été mentionné dans la partie Mucoadhésion.

Les stimuli d'origine physique, tels que la température, un champ électrique ou encore une contrainte mécanique, peuvent affecter les interactions moléculaires. Les hydrogels synthétiques démontrant une sensibilité à la température sont les plus étudiés. Ils sont le plus souvent caractérisés par la présence de groupements hydrophobes, tels que des groupements méthyl, éthyl et propyl, en plus des groupements hydrophiles typiques aux hydrogels (Qiu et Park, 2001). Certains exemples des groupements hydrophobes sont mentionnés dans la Figure 41.

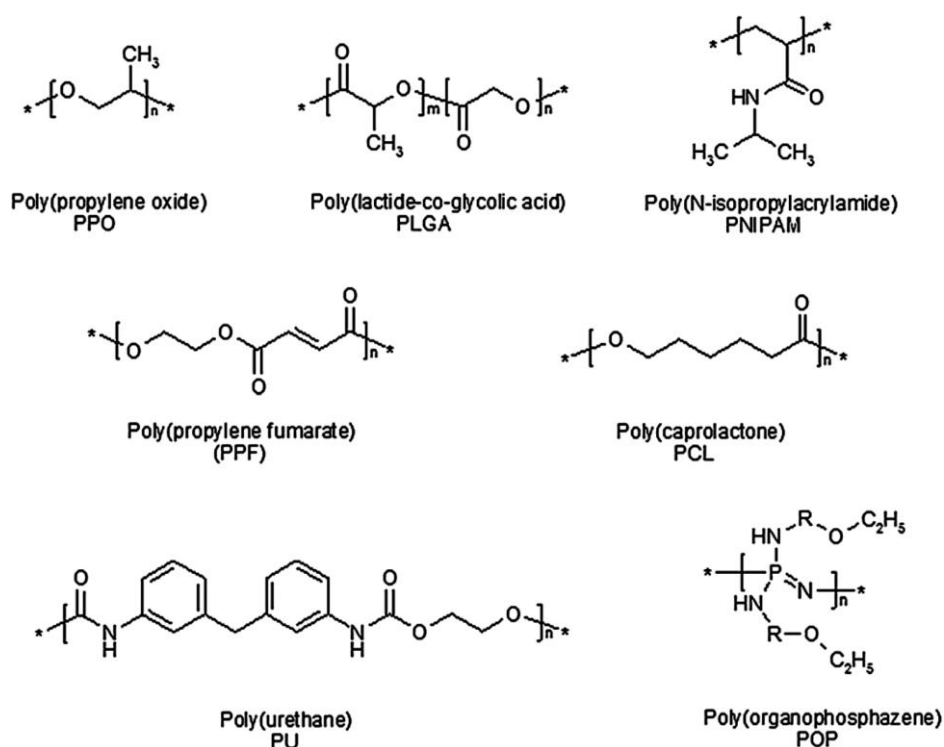


Figure 41 : Exemples de blocs hydrophobes constitutifs de copolymères pour la formulation d'hydrogels thermosensibles (Hoare et Kohane, 2008)

Concernant le mécanisme de gélification ou transition sol-gel, c'est l'interaction hydrophobe qui joue un rôle essentiel (Figure 42). Lorsque la température augmente, les liaisons hydrogènes entre le polymère et l'eau qui se créent au niveau des groupements hydrophiles diminuent et deviennent alors négligeables par rapport aux interactions hydrophobes entre les polymères. Cela conduit à la déshydratation du système polymérique suivie d'une transition de phase.

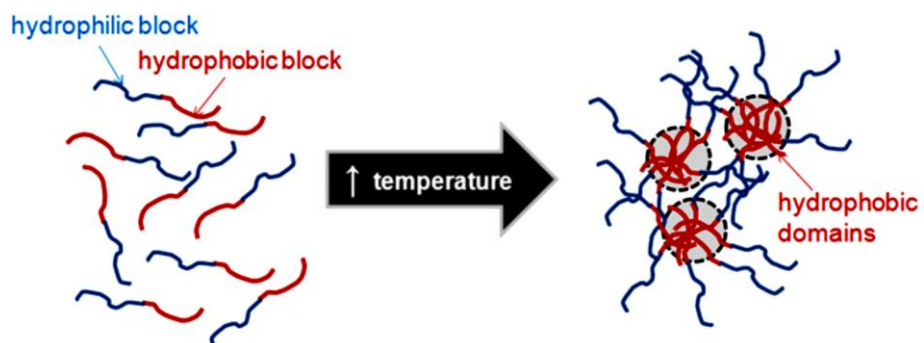


Figure 42 : Mécanisme de gélification induite par une augmentation de température (Hoare et Kohane, 2008).

En particulier, nous nous sommes intéressés aux deux analogues de la série de copolymères poloxamère : poloxamère 407 et poloxamère 188, qui sont capables de former des hydrogels thermogélifiants de manière parfaitement réversible et dont les principales caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

Pour information, sont apparus plus récemment des polymères sensibles aux stimuli biochimiques considérés comme une nouvelle catégorie à part entière. Ils ne seront pas traités dans le cadre de notre projet applicatif en innovation industrielle. Cette nouvelle classe comprend la réponse des hydrogels à des antigènes, des enzymes, des ligands ou d'autres agents biochimiques et suscitent actuellement un grand intérêt pour certaines applications biomédicales.

3. Poloxamère 407 et ses applications

Parmi les systèmes thermosensibles décrits dans la littérature, on peut citer divers polymères naturels et leurs dérivés (e.g. dérivés cellulosiques, chitosan, xyloglycane, dextran, gélatine), N-Isopropylacrylamide et ses copolymères, ainsi que les poloxamères (Ruel-Gariépy et Leroux, 2004).

Les poloxamères sont des copolymères tri-blocs dont la séquence est une succession de répétition de monomères d'oxyde de propylène (PO) et d'oxyde d'éthylène (EO). Ils peuvent s'écrire selon la formule $\text{EO}_x\text{-PO}_y\text{-EO}_x$ où x et y sont le nombre de répétition des monomères (Figure 43). Sous différents noms de marque (e.g. Pluronic®, Synperonic®, Tetronic®...), les poloxamères sont commercialisés depuis les années 50.

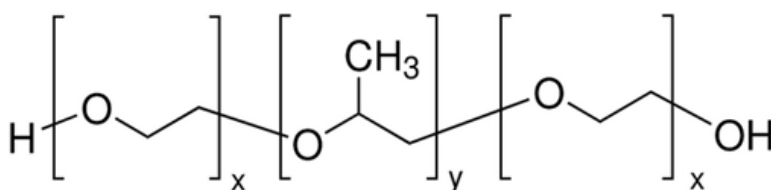


Figure 43 : Formule chimique générale des poloxamères

Etant donné leur nature amphiphile, les poloxamères sont des agents tensio-actifs non ioniques qui, suivant leurs propres caractéristiques (poids moléculaire de la partie hydrophobe, rapport polyoxyéthylène/polyoxypropylène, poids moléculaire du polymère total), ont des propriétés mouillantes, dispersantes, détergentes, émulsifiantes, solubilisantes,

moussantes ou antimoussantes (Rowe et *al.*, 2005). Les poloxamères issus de diverses Pharmacopées sont cités dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Caractéristiques des poloxamères les plus couramment utilisés (Pharmacopée Européenne 7.0, 2008)

Poloxamère	Pluronic®	Etat physique	Nombre d'unités de PEO	Nombre d'unités de PPO	Masse moléculaire moyenne (en Da)
			(x)	(y)	<i>Ph.Eur/USP</i>
124	L44	Liquide	10-15	18-23	2090-2360
188	F 68	Solide	75-85	25-30	7680-9510
237	F 87	Solide	60-68	35-40	6840-8830
338	F 108	Solide	137-146	42-47	12700-17400
407	F 127	Solide	95-105	54-60	9840-14600

Le poloxamère 407 (Pluronic®, Lutrol® F127, ou Kolliphor® P407) peut gélifier pour des concentrations plus faibles et présente une moindre toxicité. Sa formule chimique est : $\text{OH}[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_{95} [\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{O}]_{54} [\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_{95}\text{OH}$. Sa balance hydrophile-lipophile (HLB) est de 22 à 22°C (Dumortier et *al.*, 2006). La majorité des études concernant le phénomène de gélification de poloxamères a été menée avec le poloxamère 407 car, en plus des propriétés citées auparavant, il permet d'obtenir des gels transparents, incolores, faciles d'application et lavables à l'eau. La Food and Drug Administration (FDA) a présenté le poloxamère 407 comme un excipient « inerte » pour différentes préparations pharmaceutiques et cosmétiques (e.g. injectable, orale, ophtalmique, topique...).

Le poloxamère 407 est caractérisé par deux températures critiques : la température de micellisation et celle de gélification (transition sol-gel). Lorsque la température augmente, les molécules du poloxamère 407 s'agrègent en micelles, dont la forme est sphérique avec un cœur hydrophobe de PPO, et les chaînes hydrophiles de PEO à l'extérieur (Figure 44). La gélification proprement dite intervient lors de l'organisation des micelles sous des phases de type cubique. Cet enchevêtrement de micelles produit une grande viscosité, et ralentit la dissolution des gels. Le phénomène de thermo-gélification est parfaitement réversible. La température de transition sol-gel du poloxamère 407 augmente lorsque sa concentration diminue.

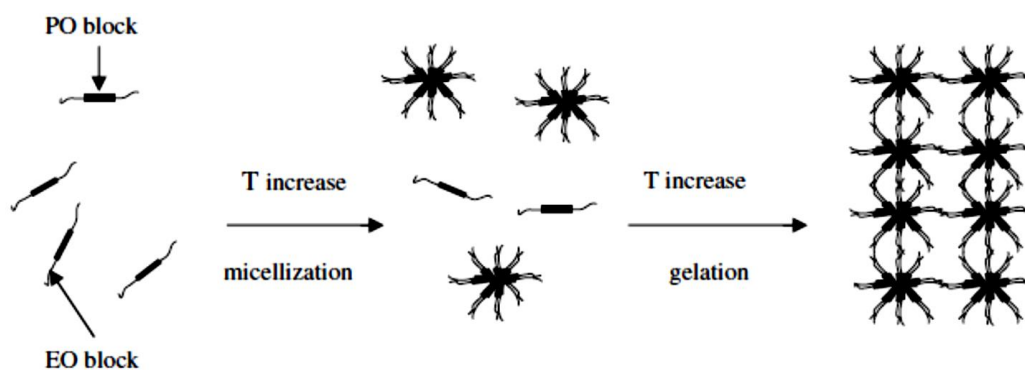


Figure 44 : Mécanisme de gélification du poloxamère 407 dans l'eau (Dumortier et *al.*, 2006).

L'incorporation de PA et d'autres additifs peut fortement modifier la température de transition. L'ajout d'acides (principalement acides forts) et d'alcools (éthanol ou isopropanol) a tendance à diminuer la rigidité des gels et à augmenter la température de transition (Vadnere et Amidon, 1984). Ces substances peuvent interagir sur la formation des micelles. En revanche, l'incorporation de sels minéraux (NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄...) ou d'autres polymères comme le Carbopol®, l'alginate de sodium entraîne une diminution de la température de transition (Das et *al.*, 2010; Su et *al.*, 2003).

Le poloxamère 407 est connu aussi pour son excellente compatibilité avec d'autres composés chimiques, sa capacité de solubilisation de diverses substances actives et son aptitude à libérer de manière prolongée les substances qu'il renferme (Morishita et *al.*, 2001). Cependant, l'hydrogel de poloxamère 407 présente faibles propriétés mécaniques et bioadhésives (Koffi et *al.*, 2006). Pour cela, plusieurs stratégies ont été proposées pour renforcer les propriétés mécaniques ou mucoadhésives des poloxamères :

- Modification chimique des chaînes polymériques (Chen et *al.*, 2011; Hsu et *al.*, 2009)
- Mélange physique avec certains polymères mucoadhésifs (Baloğlu et *al.*, 2010; Chen et *al.*, 2013; Koffi et *al.*, 2006; Ur-Rehman et *al.*, 2011)
- Ajout des petites molécules (NaCl) qui peuvent renforcer la viscosité (Choi et *al.*, 1999; Ricci et *al.*, 2005)

Nous avons retenus ces deux dernières stratégies car elles sont relativement faciles à atteindre au niveau de la fabrication.

4. Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, les généralités sur l'hydrogel et quelques exemples d'applications dans le domaine pharmaceutique ont été rappelés. Ces éléments valident que le développement d'un hydrogel constitue une stratégie intéressante en tant que système d'administration de médicament.

Parmi ceux-ci, notre brève revue bibliographique démontre l'intérêt porté aux hydrogels de transition de phase « Sol-Gel » qui peuvent être administrés sous forme liquide et se gélifier *in situ*. Parmi eux, l'hydrogel thermogélifiant paraît le plus adapté par rapport à notre application, soit une transition sol-gel rapide *in situ* intervenant sur le plus petit intervalle de température possible. Parmi ces hydrogels, nous avons retenus deux analogues de la série des poloxamères (i.e. poloxamère 407 et poloxamère 188). Malgré des nombreux avantages détaillés précédemment, l'hydrogel de poloxamère 407 présente des propriétés mécaniques mucoadhésives limitées et cela pourrait soulever un problème de drainage rapide. En effet, l'environnement buccal est soumis à de nombreuses contraintes physiques. Dans notre travail, il a été par conséquent proposé de procéder à un mélange physique du poloxamère et de la gomme xanthane afin de favoriser la persistance de la forme.

Conclusion des travaux antérieurs

La revue bibliographique confirme l'intérêt du salbutamol comme principe actif majeur dans le traitement de l'asthme chez l'enfant ou l'adulte. Néanmoins, son utilisation est confrontée à certains points critiques comme :

- Une pharmacocinétique caractérisée par une demi-vie relativement courte
- Une biodisponibilité limitée
- Une formulation rendue délicate par une instabilité en milieu neutre ou basique
- Des formes galéniques disponibles essentiellement sous forme de spray inhalateur ou solution pour générateur d'aérosol nécessitant une éducation thérapeutique (coordination main-poumon ou apprentissage de l'utilisation du générateur).

En termes de développement industriel, une forme plus adaptée pourrait mieux répondre aux attentes thérapeutiques des patients, ce qui justifie le choix de notre sujet en relation avec la thématique de recherche des laboratoires Unither Pharmaceuticals.

Par ailleurs, la voie orale classique a été écartée du fait du fort effet de premier passage hépatique, et ce malgré sa facilité d'administration. D'autres voies d'abord ont donc été envisagées comme la voie buccale. En ce qui concerne le salbutamol, cette voie devra permettre une action systémique, une facilitation de la prise, une amélioration de la compliance et de la biodisponibilité. Le principal inconvénient est constitué par le drainage de la forme par la salive ou la langue. Pour pallier à ce drainage, il est impératif de formuler une préparation mucoadhésive et résistante mécaniquement.

En ce sens, deux polymères, inscrits aux pharmacopées, peuvent répondre de par leurs propriétés intrinsèques voir synergiques. Le premier est un polymère naturel mucoadhésif, la gomme xanthane, l'autre est un copolymère thermosensible le poloxamère 407. Ils suggèrent que le choix de la gomme xanthane et du poloxamère 407 comme principaux composants de formulation pourrait conduire à une forme adaptée à notre principe actif : présentation fluide à température ambiante et persistance très améliorée de la forme *in situ*.

En ce sens, un schéma de développement initié par une phase de screening suivi par des essais *in vitro* puis *in vivo* a été élaboré afin de justifier l'intérêt de ces formulations et vérifier (ou infirmer) expérimentalement notre hypothèse de travail. Les principaux essais ont été :

- Essais *in vitro* démontrant la thermogélification parmi lesquels nous avons retenu la détermination du point de gélification et du comportement rhéologique (**Article 1**).
- Essais *in vitro* visant à mettre en évidence la mucoadhésion parmi lesquels nous avons retenu l'appareillage déterminant des forces d'arrachement. Le modèle sélectionné utilise la mucine de porc (**Travaux complémentaires**).
- Essais *in vitro* étudiant la libération du principe actif à partir de modèles avec ou sans membrane (**Article 1**).
- Essais *in vitro* de perméation parmi lesquels nous avons retenu le système Transwell®. Le modèle cellulaire TR146 a été employé dans notre travail (**Article 2**).
- Essais de tolérance parmi lesquels nous nous sommes intéressés aux essais de cytotoxicité sur la lignée TR146 (**Article 2**).
- Essais *in vivo* en imagerie pour démontrer la persistance de la forme au niveau du site d'administration. Le développement de traceur spécifique a été retenu dans le cadre de notre projet (**Travaux complémentaires**).
- Essais pharmacocinétiques chez l'animal (**Travaux en cours**)

Les critères de choix, les performances et limites des essais cités seront détaillés dans la suite de ce document dans les parties résultats et discussion.

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

Article 1: Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: relation between micellization, gelation, mechanic and release properties

Ni Zeng, Gilles Dumortier, Marc Maury, Nathalie Mignet, Vincent Boudy*

Int J Pharm. 2014 Jun 5;467(1-2):70-83. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.055. Epub 2014 Apr 1.

Abstract

Thermosensitive hydrogels developed for buccal delivery of salbutamol were prepared using poloxamer analogs (Kolliphor[®] P407/P188), xanthan gum (Satiaxane[®] UCX930) and NaCl. P188 increased gelation temperature ($T_{\text{sol-gel}}$) by 2.5-5°C, micellization temperature (<1°C) and gelation time by >3s. To obtain a suitable $T_{\text{sol-gel}}$ at 28-34°C, P407 and P188 concentrations were set to 18-19% and 1%. NaCl reduced $T_{\text{sol-gel}}$ (>2°C) out of the optimal range. Six formulations containing 0.05-0.1% Satiaxane[®] fulfilled the temperature criteria. Concerning the gel strength, 1% P188 had no significant effect, NaCl increased it at 20°C, and Satiaxane[®] enhanced it at 20°C and 37°C. The release study using membrane-less (to mimic oral cavity) and membrane (to mimic buccal mucosa side) methods allowed a complete investigation showing that erosion and diffusion both contributed to the drug release but differed according to the formulation. In the membrane-less method, simple P407 formulations had weak ability to retain salbutamol ($T_{80}=35\text{min}$). P188 accelerated drug release. NaCl accelerated release in the membrane-less method by 5-11 min but slightly reduced it in the membrane method. The hydrogels containing Satiaxane[®] exhibited the slowest release. In the membrane method, combination of P407/P188/Satiaxane[®] provided a sustained diffusion with a burst effect ($T_{25}=9.6\text{ min}$, $T_{80}=97.8\text{ min}$), which provides potential clinical interests.

Keywords: Poloxamer, xanthan gum, NaCl, drug release, flow through cell (USP 4 apparatus), mathematical modeling

1. Introduction

Although oral drug administration is the most common route, and that usually preferred by patients and clinicians, many drugs cannot be delivered effectively this way. The buccal mucosa is considered as an attractive target to administer several classes of pharmaceutical agents (Chinna Reddy et al., 2011). Indeed, as it is richly vascularized, drugs can directly enter the systemic circulation, bypassing the gastrointestinal tract and first-pass metabolism in the liver, which may result in a rapid onset of action (as in intravenous administration) and a higher bioavailability. Additionally, buccal drug delivery has an excellent patient acceptability compared to other routes of drug administration. Finally, buccal drug delivery does not require complicated technical equipment and expertise, and is thus more cost-effective than invasive therapies.

Salbutamol sulphate (SS) is a relatively selective beta 2 adrenoceptor agonist which has been widely used in the treatment of reactive airway diseases, such as asthmatic disorders and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) (“Asthme,” n.d., “Bronchopneumopathie Chronique Obstructive,” n.d.). It can also be used by intravenous and subcutaneous routes as a uterine relaxant to suspend premature labor (tocolysis) (Boulton and Fawcett, 2001).

Nowadays, salbutamol is commonly administered by inhalation in aerosol or nebulizer solution. However, pulmonary delivery requires special training on the part of patients, and the nebulizer solution demands special equipment. This may be particularly difficult for pediatric and geriatric patients. Furthermore, the plasma half-life of the drug has been estimated from 4 to 6 hours, so 2-3 inhalations must be administered every 4-6 hours to maintain therapeutic activity, which otherwise can lead to tolerance of its bronchodilator effect. When given orally (*e.g.*, tablets and syrup), its systemic bioavailability has been shown to be low and variable (10-50%, in human), and it is subjected to a first-pass intestinal or hepatic metabolism. Some studies suggest that the major part of salbutamol metabolism occurs in the intestine, resulting in a relatively low bioavailability and extensive enantioselective disposition following oral absorption (Boulton and Fawcett, 2001; Goldstein et al., 1987; Morgan et al., 1986). Thus, oral dosage forms must be taken 3-4 times daily. In addition, due to its solubility and permeability, salbutamol is considered as a class I drug in the Biopharmaceutics Classification System (BCS) (Murtaza et al., 2009). As an amphoteric compound with an acidic phenolic group and a basic secondary amine group, SS has two ionization constants: $pK_{a1} = 9.2$, $pK_{a2} = 10.2$. At a physiological pH, its solubility is not expected to be affected by its ionization (Imboden and Imanidis, 1999). On account of these

facts, SS seems to be an interesting candidate for the preparation of a controlled buccal delivery system.

In recent years, various dosage forms have been developed for buccal delivery of SS, including bioadhesive film (Singh et al., 2010) and patch (Patel and Poddar, 2009; Vasantha et al., 2011), but not much research work has been done on the thermosensitive hydrogel and the development of drug release techniques. Additionally, the preparation of film or patch requires long process, and may raise conservation and tolerance questions.

Since they were introduced in the late 1950s, the thermosensitive hydrogels of poloxamer, which can undergo a sol-to-gel transition in response to temperature, have been of great interest in drug delivery and administration (Dumortier et al., 1994; Koffi et al., 2006; Dumortier et al., 2006; Sandri et al., 2011). The Kolliphor[®] P grades with the former tradename Lutrol[®] F are synthetic triblock copolymers of a hydrophobic ethylene oxide (PEO) block and two hydrophilic propylene oxide (PPO) blocks that conform to the general formula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, and are listed in the US and European Pharmacopoeia (Rowe et al., 2005). Kolliphor[®] P407, known as poloxamer 407 with an average molecular weight of 12,600, and Kolliphor[®] P188, labelled poloxamer 188 with an average molecular weight of 8400, are two non-ionic water-soluble poloxamers which can form hydrogels (Schmolka, 1994). A poloxamer 407 formulation that is liquid at room temperature, usually 20-25°C, and that quickly forms a gel at 34-35°C, would be convenient to use with a buccal spraying device (Sandri et al., 2011). Thermoreversible gelation is a result of micellar entanglement and packing when the temperature increases. The micellization of poloxamer is more complex than that of common amphiphile molecules. Due to hydrophobic interactions between PPO blocks, the poloxamer molecules self-assemble as micelles in solution above the critical micellization concentration (CMC). Moreover, micelles can form as a function of temperature (CMT, critical micellization temperature) (Singh et al., 2013). The differential scanning calorimetry experiments demonstrates that the micellization process of poloxamer in water is endothermic. Increasing temperature leads to greater interactions between PPO blocks. Bringing some energy to the systems by raising temperature, allows reducing the CMC. In brief, the micellization can occur in two ways: setting the concentration of poloxamer above the CMC, or adjusting the temperature to CMT. The CMC and CMT depend on the PPO/PEO ratio and also on the molecular weight of the poloxamer, however no sharp or identical values have been observed (Alexandridis and Alan Hatton, 1995). The micellization process corresponds to the very first step of gelation. As the hydrophobic block PPO lowers the micellization and gelation temperatures, and the

hydrophilic PEO increases them, the gelation performance can be modulated by mixing the two poloxamer analogs P407 and P188 (Qi et al., 2007; Xuan et al., 2011). Additionally, the high solubilizing capacity and the low toxicity also make them an attractive vehicle for buccal drug delivery (Dumortier et al., 2006). Nevertheless, the main drawbacks of poloxamer hydrogels for drug delivery applications include a limited stability, poor mechanical properties and short residence times due to a rapid dissolution once placed in biological environments. As a consequence, many attempts have been done to chemically modify poloxamer gels (Chen et al., 2011; Hsu et al., 2009) so as to obtain appropriate mechanical properties. An interesting approach focuses on blending poloxamer with mucoadhesive polymers (Baloğlu et al., 2010; Chang et al., 2002; Chen et al., 2013; Ur-Rehman et al., 2011), which are able to form entanglements or non-covalent bonds with the mucus covering epithelial tissues, thus prolonging the hydrogel's *in vivo* residence time. As a high-molecular mass polysaccharide composed of D-glucose and D-mannose as the dominant hexose units, xanthan gum is considered to be biocompatible and biodegradable, and has been widely used as a suspending, thickening and stabilizing agent in oral and topical formulations. It can also be used to increase bioadhesive strength (Ceulemans et al., 2002; Vermani et al., 2002). To increase gel mechanical strength, some small molecular ionic agents like NaCl can be incorporated into the poloxamer gel. Some studies suggest that salts might have a significant influence on the gelation and strength properties of poloxamer gel (Choi et al., 1999; Ricci et al., 2005) as well as on the drug release profile (Moore et al., 2000; Pandit and Wang, 1998).

In this context, we wished to design a novel thermosensitive sprayable hydrogel base for buccal delivery of salbutamol with optimized gelation temperature (28-34°C), suitable mechanical properties (*e.g.* viscosity less than 200 mPa.s at room temperature, higher than 10 000 mPa.s after gelation *in situ*), mucoadhesive properties, and also relatively sustained drug release. To obtain these properties, four components: P407, P188, xanthan gum and NaCl were combined with various concentrations, and then their influences were evaluated *in vitro*. In this paper, we focus on the measurement of gelation and micellization temperatures, the determination of mechanical force and apparent viscosity, and finally the drug release study by a membraneless and a membrane diffusion methods based on the USP4 apparatus (flow through cell), completed with a mathematical modeling. The relations between the different parameters were statistically analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

SS of European Pharmacopoeia grade (molecular weight 576.7) was purchased from Farmalabor srl (Canosa di Puglia, Italy). Kolliphor[®] P407 and Kolliphor[®] P188 of pharmaceutical use grade were obtained gratis from BASF (Ludwigshafen, Germany). Satiaxane[®] UCX930 (xanthan gum) was obtained gratis from Cargill France (Saint-Germain-en-Laye, France). The sodium chloride (NaCl), sulphuric acid (H₂SO₄) and chloride acid (HCl) of analytical grade were obtained from VWR International (Fontenay-sous-bois, France). The sodium phosphate buffer (NaPi) powder (0.1 M) was purchased from Euromedex (Strasbourg, France). All the solutions were prepared using sterile water Versylene[®] purchased from Fresenius Kabi France (Sèvres, France).

2.2. Preparation of formulations

The hydrogel was prepared on a volume basis. Concentrations of all the components reported here are expressed as weight/volume percentage (% w/v). The poloxamer solutions were prepared using the cold method (Schmolka, 1972). P407 (17-19%) or P407 combined with P188 (1%) were slowly added to a certain volume of sterile water, and then the preparations were left at 4°C until clear solutions were obtained. The preparations were then gently homogenized with magnetic stirrers. Sterile water was then added to adjust the volume to the total amount.

For preparation of the blend of poloxamer/Satiaxane, the Satiaxane (0.05-0.1%) solutions were first prepared by dispersing the required amount in a certain volume of sterile water, stirring continuously until complete dissolution. Then the required amount of P407 and P188 were added to the already swollen Satiaxane solution. The following procedures were the same as described above. When NaCl (1-2%) was used, it was first dissolved in water. For all the samples, SS was added and dissolved last, then the clear and homogeneous solutions were adjusted to a pH value between 3.0 and 3.5 by 0.4 M sulphate acid to get molecule chemical stability (Mälkki-Laine et al., 1995). Then the samples were stored in the refrigerator at 4°C for further study. The compositions of prepared formulations are shown in Table 1.

Since the drug delivery via buccal route is expected to have a comparable effect as in the systemic delivery, the posology of Salbutamol in this study was set to 0.5 mg per dose regarding Ventolin[®] Injection 0.5mg/mL, which corresponds to 0.6 mg SS. This dose is suitable for the management of an asthmatic attack, and for uncomplicated premature labour.

Then, the sprayed volume that could be used for *in vivo* tests was evaluated to 300 µL regarding the available device and the suitable volume for buccal cavity pulverization (Bernstein, 2008; McInnes et al., 2008). Consequently, the concentration of SS was set to 0.2%. Then, the formulation evaluations (*i.e.* gel strength and drug release) were carried out using 300 µL hydrogel containing 0.6mg SS.

The buccal mucosal surface is covered by a mucus layer, as a part of saliva, its functions are to lubricate, protect and to wet the oral cavity. Generally, saliva (0.5-2 L/day) is a weak buffer with a pH around 5.8-7.4, containing moderate enzymes (Hao and Heng, 2003). Then it provides satisfactory protection against acidic medication or liquid (*i.e.* cola, fruit juice). So it can be hypothesized that hydrogels (300 µL) acidified for stability reason (*e.g.* pH 3.0-3.5 without any acid buffer) would be well tolerated. However further toxicity and tolerance studies have to be carried out to detect any deleterious effect.

Table 1

Composition of salbutamol sulphate 0.2% formulations (pH 3.0-3.5).

Formulation Code	P407 (%)	P188 (%)	Satiaxane® (%)	NaCl (%)
F1	17	-	-	-
F2	18	-	-	-
F3	18	-	0.05	-
F4	18	-	0.1	-
F5	18	-	-	1
F6	18	-	-	2
F7	18	1	-	-
F8	18	1	0.05	-
F9	18	1	0.1	-
F10	19	-	-	-
F11	19	-	0.05	-
F12	19	-	0.1	-
F13	19	-	-	1
F14	19	1	-	-
F15	19	1	0.05	-
F16	19	1	0.1	-

P407: Kolliphor® P407; P188: Kolliphor® P188; Satiaxane®: Xanthan gum

2.3. Thermal analysis of poloxamer formulations

2.3.1. Measurement of the sol-gel transition temperature ($T_{\text{sol-gel}}$) with a visual method

To determine the $T_{\text{sol-gel}}$, 15 ml hydrogel which had been kept at 4°C in refrigerator was put in a transparent glass vial (50 ml) containing a magnetic stirrer, and then the vial was placed on a heating plate. The hydrogel was heated gradually while stirred at a constant rate (50 rpm). When the stirrer stopped moving due to the gelation, the heating was turned off. The gel formation was considered to be achieved when there was no flow when the vial was tilted more than 90°. To avoid heating un-homogeneously, the sol-gel transition temperature was considered as the point where the gel began to flow. Five replicate determinations were performed for each formulation. Although very simple, this technique of determining sol-gel transition temperature is commonly used for poloxamer gels and gives reproducible results (Chen et al., 2011; Shastri et al., 2010).

2.3.2. Evaluation of micellization and gelation with differential scanning calorimetry (DSC)

In order to analyze the self-assembling and thermogelation properties, calorimetric experiments were carried out using a Mettler-Toledo DSC 1 system (Viroflay, France) equipped with Stare software. For analyses of all samples the reference cell was filled with sterile water used for the formulation preparation. The thermograms were obtained by heating the sample from 5 to 40°C at a scan rate of 5°C/min. The pre-scan equilibration time was set to 7 min. To better illustrate the micellization and gelation signal, the derivative (mW/°C) of initial thermogram was plotted (Nie et al., 2011). In the initial thermogram, the peak area was considered as the micellization energy, and the energy per gram was calculated. In this study, formulations without drug were also investigated.

2.4. Rheological analysis

The rheological analysis was carried out using an Anton Paar MCR 500 rheometer (Courtaboeuf, France), equipped with a cone plate combination (diameter = 50 mm; angle = 1°) as measuring system. Firstly, non-destructive oscillatory measurements at 1 Hz, performed in this study, allow one to obtain the elastic modulus (G'), the viscous modulus (G'') and the phase angle ($\tan \sigma = G''/G'$). The plate was heated at a rate of 1°C/min from 20°C to 40°C. The sol-gel transition temperature was defined as the point where G' began to shift to higher temperatures (Sandri et al., 2011). Moreover, the apparent viscosity (Pa·s) and the shear stress (Pa) of formulation were also measured with a continuous shear (flow) model. The shear rate was increased from 10 to 300 s⁻¹. The measurements were carried out at 20°C

(storage and application temperature) and at 37°C (temperature of buccal mucosa) in triplicate.

Gelation time has been described as the time necessary to obtain a transition from a fluid to a gel state. Gelation time value allows comparing different formulations but highly depends on experimental conditions. Different methods have been developed, like oscillation rheological method (Chang et al., 2002) or visual assessment (Shastri et al., 2010). In this study, gelation time was also investigated, using a Brookfield DV II rheometer with a concentric cylinder (Middleborough, USA). 20 mL hydrogel were placed in a thermostated adapter where the sample temperature was progressively increased from 20°C to 40°C. The shear rate was set to 12.5 s⁻¹. The gelation time was defined as the time required for the increase of apparent viscosity value from 1 to 10 Pa·s. The measurement was performed in triplicate. Anyhow, it concerns a relative evaluation.

2.5. Texture properties of formulation

A tensile test was applied in this study. The mechanical properties of the gels were evaluated using a software-controlled dynamometer MTS Synergie 1000 (Creteil, France) equipped with two stainless steel plates which have a diameter of about 50 mm and a detector with a capacity of 100 N. In brief, a defined volume of each formulation (300 µl) was placed carefully on the lower plate, and the upper plate was applied in contact with the hydrogel for 1 min. The upper plate linked with the detector was then moved upwards at a constant speed of 10 mm/min until the complete break of the hydrogel. At least five replicate analyses were performed for each formulation at 20°C and at 37°C, using a fresh sample in each case. In the software, the force of detachment (N) as a function of displacement was recorded. Then the maximum detachment force ($F_{\max}$) was analyzed as the parameter representing the texture profile in this study.

2.6. *In vitro* drug release study using the USP 4 apparatus

Various *in vitro* release studies of poloxamer 407 were carried out using different apparatus (Moore et al., 2000; Qi et al., 2007; Ricci et al., 2005). Many of these studies have examined the diffusion of the drug out of the gel in aqueous media, often with an intervening membrane. The experimental conditions have been such that the gel itself does not dissolve in the medium. In general, these studies show that drug release follows the Higuchi square root law. However, when poloxamer hydrogel is used in buccal cavity, it adheres to the buccal mucosa but also encounters an aqueous environment with a constant flow of saliva, so a release of drug in “biface” occurs on the buccal mucosa. In order to obtain a global understanding of the drug release mechanism from the poloxamer gel and to simulate the

physiological environment of the buccal cavity, all the drug release experiments were carried out using a USP 4 apparatus (flow through cell) (“USP - NF,” 2013) provided by the company SPS Pharma Services (Orléans, France) with two cell models: the standard cell without membrane and an adaptor for semisolid forms with membrane. This investigation was initiated to study the effects of each additive on the release mechanism. Concerning the dissolution media, since the pH of saliva varies from 5.8 to 7.4, in both release models, the sodium phosphate buffer (NaPi, 0.1 M) at pH 6.8 was used as dissolution media in concordance with other studies (Singh et al., 2010). Additionally, as SS is a Class I molecule in the BCS classification, its solubility in aqueous media is considered high, providing “sink conditions” in our *in vitro* release models (i) and is pH independent in the physiological conditions (ii): 263.5 mg/mL at pH 3, 261.6 mg/mL at pH 7.4 (Imboden and Imanidis, 1999).

2.6.1. *In vitro* drug release evaluation using the standard cell

To mimic the aqueous environment of the buccal cavity, seven standard cells with a diameter of 22.6 mm were used in all experiments. Operated in the closed configuration, the automated system CE7 smart Sotax (Basel, Switzerland) was linked to a piston pump Sotax CP7-50 (Basel, Switzerland) and a UV-VIS spectrophotometer Lambda 20 Elmer Perkin (Norwalk, USA) for a direct online analysis. In each cell, a ruby bead of 5 mm in diameter and glass beads of 1 mm in diameter were placed in the apex of flow-through cell in order to ensure laminar flow. About 300 μ L hydrogel was placed into the glass bead bed. Before starting the test, the system was placed in a 37°C oven until the solution gelled and equilibrated. During the test, 50 mL NaPi was pumped through each cell with a flow rate of 5 mL/min. Temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ was maintained throughout the study. The concentration of SS was determined at regular intervals by UV absorption spectrophotometer at 222 nm, corresponding to the wavelength of maximal absorption. Unloaded hydrogels were also tested and used as reference. Trials were carried out in triplicate. Drug release profiles obtained with the closed configuration, *i.e.*, cumulative percentage of drug release (M_t/M_∞ , %) *versus* time (t, min), were plotted.

2.6.2. *In vitro* drug release evaluation using the semisolid adapter (SSA)

To evaluate the diffusion profiles of SS from the hydrogels, an adapter for semisolid forms (SSA) (“USP 36-NF 31: (1724) Semisolid drug products-Performance tests,” 2013) was applied. The adapter was designed to be used with the 22.6 mm cell of USP 4 apparatus (Fig. 1a). Generally, the SSA consists of two basic components: a reservoir where the product was introduced and a ring where the membrane was held. The geometric parameters were described in Fig. 1b. About 300 μ L hydrogel was placed in the reservoir, and the ring fitted

with an acetate cellulose membrane (0.45 μm) was screwed onto the reservoir with a specific tool. The adapter was then slid into the cylindrical part of the cell with the membrane facing downward. A closed system was applied as well (Fig. 1c). The flow rate was set at a higher value, 15 mL/min. This was due to slow rate of diffusion. The testing procedure was the same as previously described in the standard cell.

2.7. Mathematic modeling of drug release kinetics

To investigate the kinetics of drug release from hydrogels, several mathematical models like Higuchi, zero-order, Korsmeyer-Peppas and Peppas-Sahlin were applied. The times for 25%, 50% and 80% release of drug (T_{25} , T_{50} and T_{80} respectively) were also calculated from the Korsmeyer-Peppas equation. The mentioned kinetics is described below.

The release of drug from a polymeric matrix is a function of the square root of time in accordance to the Fickian behavior, as shown in the Higuchi release model:

$$M_t/M_\infty = K_h t^{1/2} \quad \text{Eq 1}$$

where M_t/M_∞ is the fraction of drug release at each time point t , and K_h represents the Higuchi release kinetic (diffusion) constant.

The zero-order model illustrates the systems where the rate of drug release is independent of the initial concentration of drug:

$$M_t/M_\infty = K_0 t \quad \text{Eq 2}$$

where K_0 represents the zero-order kinetic constant.

To determine the drug release mechanism, the power law exponential expression Korsmeyer-Peppas, which has been extensively used in various pharmaceutical systems (Baloğlu et al., 2010; Baloglu et al., 2011; Nie et al., 2011), was also applied.

$$M_t/M_\infty = K_{kp} t^n \quad \text{Eq 3}$$

where K_{kp} is a kinetic constant, n is the release exponent which is indicative of the mechanism of drug release. Sometimes, the exact drug release mechanism is unknown or more than one release mechanisms are involved because the release mechanism from polymeric systems is complex and it can also depend on the dissolution test conditions. In this case, the Korsmeyer-Peppas model is recommended.

When n approximates 0.5, a Fickian/diffusion-controlled release is implied, where $n = 1.0$ indicates a case II relaxational release transport (zero-order release). Values of n between 0.5 and 1.0 can be regarded as an indicator of both phenomena, commonly called anomalous transport or non-Fickian diffusion (Costa and Sousa Lobo, 2001).

To quantify the contribution of the relaxation or erosion mechanism and of the diffusive mechanism, a binomial equation, similar in meaning to Korsmeyer-Peppas equation, was proposed by Peppas and Sahlin (Peppas and Sahlin, 1989):

$$M_t/M_\infty = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad \text{Eq 4}$$

where K_1 is the diffusion constant, K_2 is the relaxation (erosion) constant and m is the diffusional exponent. According to the geometric characteristics of the system, the m value of 0.5 was taken in our study. Thus, a simple expression coupling the diffusion and relaxation mechanisms can be written as:

$$M_t/M_\infty = K_1 t^{1/2} + K_2 t \quad \text{Eq 5}$$

And the percentage of diffusion at time t is given by:

$$M_{t1}/M_t = 1 / (1 + (K_2/K_1) t^{1/2}) \quad 100\% \quad \text{Eq 6}$$

While the percentage of relaxation is obtained by:

$$M_{t2}/M_t = 100\% - 1 / (1 + (K_2/K_1) t^{1/2}) \quad 100\% \quad \text{Eq 7}$$

The drug release kinetics was determined by fitting the experimental data to the kinetic models. The values of kinetic parameters were obtained by analyzing the data in a computer program called DDSolver (Zhang et al., 2010).

2.8. Statistical analysis

The statistical significance of all the parameters obtained was analyzed using one way ANOVA ($p < 0.05$) (Statview 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). Then the Pearson correlation test was applied to require the correlation levels between these parameters. The correlation was considered significant if $p < 0.05$. For the comparison of different drug release profiles, the difference factor f_1 was calculated using DDSolver program. As the factor is sensitive to the number of time points, a limit of data (one time point after 85% drug released) was analysed. Two profiles were considered similar if f_1 was less than 15.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of formulation on gelation performance

The sol-gel transition temperature ($T_{\text{sol-gel}}$) is the temperature at which the transition from the liquid phase to the gel occurs. The $T_{\text{sol-gel}}$ range which would be suitable for a sprayable gel is 28-34°C. If $T_{\text{sol-gel}}$ is lower than 28°C, the gel would form at room temperature, leading to difficulties in manufacturing and administration. If the $T_{\text{sol-gel}}$ is higher than 34°C, the hydrogel will remain liquid in the buccal cavity as the sol-gel transition is not immediate. Then the release of drug will not be sustained.

The effect of each additive on $T_{\text{sol-gel}}$ is shown in Table 2. Using the visual vial inversion method, the increase of P407 concentration revealed a significant decrease in $T_{\text{sol-gel}}$ ($p < 0.05$). The P407 hydrogel with the lowest concentration (*i.e.* 17%) did not cause any gel transition at 37°C (physiological temperature of the buccal cavity). Hence, two higher concentrations 18% and 19% have been selected as the P407 basic concentrations. On the contrary, the addition of P188 increased the $T_{\text{sol-gel}}$. It is well known that poloxamer molecules in aqueous solution will self-assemble to form spherical micelles with a dehydrated PPO core surrounded by hydrated swollen PEO chains above a critical concentration (CMC) or a critical temperature (CMT) (Dumortier et al., 2006). P188 has a higher PEO/PPO ratio and a smaller molecular weight than P407, which increases the $T_{\text{sol-gel}}$ and also the gelation time. Thereby the optimal $T_{\text{sol-gel}}$ can be reached by mixing different amounts of P407 and P188 in aqueous solution. Accordingly, the concentrations of P407 and P188 were set to 18-19% and 1%, respectively. As an ionic strength-controlling agent, NaCl was found to reduce the $T_{\text{sol-gel}}$, which was probably due to the salting-out effect (Vadnere et al., 1984). The reduction in $T_{\text{sol-gel}}$ for P407-NaCl systems has been previously reported and it was well known that water structure-making salts could reduce the CMC and CMT of P407 (Choi et al., 1999; Pandit and Kisaka, 1996; Ur-Rehman et al., 2010). However, its gelation time was longer. In order to enhance the mucoadhesive ability, Satiaxane with different concentrations was incorporated to the poloxamer gel bases. It was observed that Satiaxane increased the $T_{\text{sol-gel}}$, while the difference between 0.05% and 0.1% was not significant ($p > 0.05$). And the gelation time was more or less influenced with the presence of Satiaxane. Besides, the sol-gel transition temperatures measured by rheological method are in positive agreement with those obtained from the visual method (Table 2) ($p < 0.05$) although the values were not exactly identical. This was probably due to the different sample volume and sensibility of the method. In the visual methods, six formulations containing Satiaxane fulfilled the temperature parameters criteria, expect F11 and F12.

Table 2

Effect of formulation on the sol-gel transition performance: $T_{\text{sol-gel}}$ ($\pm$ SD, $n = 5$) measured by visual method in comparison with rheological data ($n = 1$) and gelation time ($\pm$ SD, $n = 3$) measured by rheological method.

Formulation	$T_{\text{sol-gel}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\text{sol-gel}}$ ($^{\circ}\text{C}$) (rheology)	Gelation time (s)
<i>Effect of P407</i>			
F1 (P407 17%)	> 37	ND	ND
F2 (P407 18%)	28.6 ± 0.1	28.8	17 ± 3.5
F10 (P407 19%)	25.4 ± 0.3	27.5	18 ± 0
<i>Effect of P188</i>			
F7 (P407 18%/P188 1%)	31.1 ± 0.2	30.8	24 ± 0.0
F14 (P407 19%/P188 1%)	30.7 ± 0.1	31.1	18 ± 0
<i>Effect of NaCl</i>			
F5 (P407 18%/NaCl 1%)	25.4 ± 0.3	27.3	25 ± 3.5
F6 (P407 18%/NaCl 2%)	24.7 ± 0.3	ND	ND
F13 (P407 19%/NaCl 1%)	23 ± 0.2	ND	ND
<i>Effect of Satiexane</i>			
F3 (P407 18%/Satiexane 0.05%)	29.3 ± 0.1	27.8	ND
F4 (P407 18%/Satiexane 0.1%)	29.1 ± 0.3	28.6	18 ± 3
F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	33.1 ± 0.2	34.1	24 ± 5.2
F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	33.7 ± 0.2	33.6	27 ± 0
F11 (P407 19%/Satiexane 0.05%)	28.1 ± 0.2	29.8	18 ± 0
F12 (P407 19%/Satiexane 0.1%)	28.2 ± 0.6	29.8	18 ± 0
F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	33.4 ± 0.3	31.6	21 ± 0
F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	32.4 ± 0.2	32.3	27 ± 0
ND: not determined when $T_{\text{sol-gel}} > 37^{\circ}$ or $< 25^{\circ}\text{C}$			

3.2. Effect of formulation on micellization

However, our investigation of sol-gel transition temperature with visual and rheological methods was the macroscopic evidence of the poloxamer temperature-induced association and of growing interactions between micelles. DSC thermal analysis was carried out to get more useful information about the micellization properties of the poloxamer systems and the effects of each component. An example of a derivative DSC scan is given in Fig. 2, which shows the profiles in presence of SS and without it. Without SS, two endothermic peaks were observed in the range of 5°C-40°C: the first one with a significant amplitude, corresponding to micelle formation (T_m); the second one, which appeared at higher temperature, representing the micelle rearrangement (gelation) (T_g) confirmed in other publications (Bonacucina et al., 2007; Nie et al., 2011; Ur-Rehman et al., 2010). However, the gelation peak area was found to be much smaller than that of micellization. When presence of SS, the gelation peak was too small to be identified (Fig. 2). Although the values of T_g were obtained only in the formulations without SS and that were lower than those of $T_{sol-gel}$ obtained by visual method and rheology, a high correlation was found between these parameters ($p < 0.05$). As can be seen in Table 3, P188 and Satiaxane tend to increase the T_g and slightly the T_m , while NaCl did the opposite. It indicates that both micellization and gelation (micelle rearrangement) were shifted by formulations. However, the effect of 1% P188 on gelation (sol-gel transition) was found to be more remarkable than on micellization, which is probably due to the fact that their effects on PEO chains are more important than their effects on PPO cores. For example, the T_g of F7 (P407 18%/P188 1%) increased by about 4.2°C when compared to F2 (P407 18%), while the T_m increased only by 0.9°C. It is generally accepted that the monitor of micellization is the dehydration of PPO block, and that once the micelles formed, the rearrangement of micelles depends on the interaction between the hydroxylic groups. It is reasonable to suppose that the presence of P188 may disturb the formation of hydrogen bonds between the micelles of P407, in which case the gelation becomes more difficult, and thus T_g increases. This can also explain the fact that the gelation time was increased by P188. In the case of NaCl, Su *et al.* (2003) indicated that the decrease of PPO block solubility by the addition of NaCl was the dominant reason for the decrease of T_m . The addition of NaCl can increase the polarity of the water, which results in a decrease in the solubility of PPO and PEO.

In both the absence and presence of drug molecule, the energy change of micellization was negative, since thermodynamically stable micelles formed spontaneously. As previously mentioned, the energy of micellization that corresponds to the area under the endothermic

peak was more or less reduced by adding other components. As reported by Alexandridis and Alan Hatton (1995), the free energy of micellization is mainly a function of the PPO block. These effects might be due to their ability to disrupt water structures, and thus modulate the water shells around the PPO block.

Table 3

Effects of formulation and drug loading on micellization and gelation properties obtained from DSC.

Formulation	Without SS		With SS		
	T _m	T _g	T _m	T _g	ΔG
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)
<i>Effect of P407</i>					
F2 (P407 18%)	12.7	23.9	13.4	Undetectable	-3.35
F10 (P407 19%)	12.7	22.6	13.3	Undetectable	-3.34
<i>Effect of P188</i>					
F7 (P407 18%/P188 1%)	13.6	28.1	14.3	Undetectable	-3.04
F14 (P407 19%/P188 1%)	13.0	26.0	13.9	Undetectable	-3.06
<i>Effect of NaCl</i>					
F5 (P407 18%/NaCl 1%)	11.6	22.6	12.1	Undetectable	-3.06
F13 (P407 19%/NaCl 1%)	11.4	22.2	12.2	Undetectable	-2.85
<i>Effect of Satiexane</i>					
F3 (P407 18%/Satiexane 0.05%)	14.1	25.0	15.0	Undetectable	-2.94
F4 (P407 18%/Satiexane 0.1%)	13.9	25.0	14.4	Undetectable	-3.04
F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	13.3	29.0	14.0	Undetectable	-2.94
F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	13.4	29.0	13.7	Undetectable	-3.06
F11 (P407 19%/Satiexane 0.05%)	13.5	24.2	14.1	Undetectable	-3.18
F12 (P407 19%/Satiexane 0.1%)	13.6	24.2	14.3	Undetectable	-3.23
F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	12.7	26.0	13.6	Undetectable	-3.37
F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	13.0	26.9	13.7	Undetectable	-3.29

T_m: micellization temperature; T_g: gelation temperature; ΔG: free energy

3.3. Effect of formulation on gel strength and viscosity

Gel strength and viscosity analyses are mechanical tests that describe the intrinsic properties of hydrogel. Investigated using a dynamometer fitted with force and displacement transducers, the force and work required to break the intrinsic physical interaction could be relevant to the performance of gel formulations, *e.g.* ease of application to the surface

(pulverization) and retention of the product at the site of application. Additionally, the apparent viscosities of the gel formulations were measured at different shear rates with a rheometer.

All the values obtained in the same conditions were analyzed with Fisher test to investigate the difference between each other and the effect of formulation. At 20°C, the addition of NaCl and Satiaxane (Table 4) increased the $F_{\max}$ ($p < 0.05$). The effect of NaCl on enhancing the poloxamer gel strength is well known (Choi et al., 1999; Ricci et al., 2005): NaCl is believed to make the PEO-PEO chain interactions stronger due to the decrease in hydrogen bonding with water, and thus make the gel network tighter (Moore et al., 2000). Nevertheless, the addition of P188 showed no significant effect on the $F_{\max}$ ($p > 0.05$). At 37°C, all formulations exhibited significantly higher $F_{\max}$ than at 20°C ($p < 0.05$), which confirmed the phase transition. The influence of formulation factor on $F_{\max}$ was found to be more important when the hydrogels were investigated at 20°C, whereas once the formulations were in gel state at 37°C, the difference between each formulation was smaller. For example, the differences of $F_{\max}$ within F2, F3 and F4 were not significant ($p > 0.05$). As for the viscosity measurement, the values at 20°C are in positive agreement with the values of $F_{\max}$ ($p < 0.05$) at 20°C. For the data obtained at 37°C, the statistical analyses demonstrated that the rheological method might be more sensitive and discriminant for investigating the gel strength at 37°C. For example, when comparing F3-F9 with F2, their differences to F2 were all significant ($p < 0.05$), however this was not found in the $F_{\max}$ data. Nevertheless, an increase of mechanical properties due to the presence of Satiaxane was observed in this study.

In the continuous shear rheology study, all the tested formulations exhibited shear-thinning behavior (pseudoplastic flow) at 37°C. An example illustrating viscosity *versus* shear rate under different temperatures is given in Fig. 3. Formulations containing Satiaxane exhibited higher viscosity than control P407 formulations (18%, 19%). However, at 20°C, all the tested formulations demonstrated Newtonian flow behavior with a constant viscosity, while the Satiaxane formulations provided higher viscosity. The measurement of apparent viscosity at 20°C could help optimizing the spray device.

Table 4

Textural parameters of the developed formulations, effects of formulation and temperature ($\pm$ SD, n = 5-6 for the experiments by dynamometer, n = 3 for the rheometer)

Formulation	$F_{\max}$ (N)		Viscosity at low stress 10 s^{-1} (Pa.s)	
	20°C	37°C	20°C	37°C
<i>Effect of P407</i>				
F2 (P407 18%)	14.12	21.30	0.044	13.507
	± 2.38	± 1.90	± 0.002	± 0.19
F10 (P407 19%)	16.63	24.06	0.043	13.230
	± 3.06	± 0.87	± 0.001	± 0.401
<i>Effect of P188</i>				
F7 (P407 18%/P188 1%)	14.81	23.66	0.044	9.612
	± 1.56	± 1.48	± 0	± 0.426
F14 (P407 19%/P188 1%)	14.53	24.16	0.063	14.670
	± 0.65	± 2.18	± 0.001	± 0.291
<i>Effect of NaCl</i>				
F5 (P407 18%/NaCl 1%)	17.03	24.15	0.069	12.290
	± 0.94	± 3.12	± 0.001	± 0.161
F13 (P407 19%/NaCl 1%)	22.22	25.84	ND	ND
	± 2.24	± 3.50		
<i>Effect of Satiexane</i>				
F3 (P407 18%/Satiexane 0.05%)	20.62	23.29	0.104	16.043
	± 3.09	± 1.35	± 0.001	± 0.382
F4 (P407 18%/Satiexane 0.1%)	20.26	24.17	0.157	15.370
	± 0.67	± 1.01	± 0.001	± 0.028
F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	20.99	22.59	0.092	ND
	± 2.37	± 1.66	± 0.003	
F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	21.81	23.94	0.157	11.895
	± 2.04	± 1.47	± 0.009	± 0.884
F11 (P407 19%/Satiexane 0.05%)	20.56	25.68	0.088	14.110
	± 2.20	± 1.47	± 0.001	± 0.052
F12 (P407 19%/Satiexane 0.1%)	22.75	26.44	0.162	16.34
	± 2.27	± 0.75	± 0.002	± 0.049
F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%)	19.12	27.31	0.121	15.57
	± 1.55	± 4.11	± 0.001	± 0.27
F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1%)	22.46	26.3	0.157	13.08
	± 2.69	± 1.68	± 0.001	± 0.35

ND: not determined

3.4. Effect of formulation on drug release profiles

3.4.1. Effect of formulation evaluated using the standard flow through cell

The mechanisms by which drug is released are complex and involve different processes, such as diffusion and erosion. In this study, to mimic the buccal cavity, the drug release behaviors of developed formulations were studied using the standard cell of the USP 4 apparatus at 37°C. The effects of P407, P188, NaCl and Satiaxane are shown in Fig. 4 and 5. When compared with the solution of SS (Fig. 4a), the hydrogels P407 showed a slower release, while the release rate reduced when the concentration increased. The P407 17% showed the fastest release rate, due to the absence of gel formation at 37°C. However, it was observed that the difference between P407 18% and 19% was less than between 17% and 18% ($f_1 > 15$) in the standard cell condition, indicating the monitor and mechanism of release are complicated. For hydrogels containing P188, it was found (*cf* Fig. 4b) that the release was faster in all cases. Moreover, a slight initial burst release was observed as well. In a similar way, the addition of NaCl accelerated the drug release (Fig. 4c). It is known that P188 has a different ratio PEO/PPO and a different molecular weight from P407, so the incorporation of P188 could modify the micelle formation and network structure, which was confirmed in the DSC analyses. Consequently, the release of SS was modified. In the case of NaCl, although its ability of enhancing the poloxamer gel strength is well known, the release of the drug was accelerated. This observation is consistent with other studies (Moore et al., 2000; Ricci et al., 2005). It was suggested that the addition of NaCl increases the water uptake rate into the gel due to an osmotic effect, which reduces the dissolution time of the gel. As a consequence, the release of SS is accelerated. The formulations containing Satiaxane were prepared in order to combine mucoadhesion and thermosensitive characteristics. In Fig. 5, compared to the P407 alone, a remarkable sustained release of SS was observed after the inclusion of Satiaxane even at low concentrations (0.05 and 0.1%), which not only fortified the gel strength but also provided a less permeable matrix.

To understand the drug release mechanisms under the condition without intervening membrane, the mathematical models described below were applied. The Korsmeyer-Peppas and Peppas-Sahlin 2 equations led to higher adjusted coefficient of determination (R^2_{adjusted}) values for all the formulations (Table 5) and were the most suitable models for further analyses. The reason for using R^2_{adjusted} as the indicator of the fit level rather than R^2 is that these four mathematic models have different numbers of parameters (Zhang et al., 2010).

As described in the section “Mathematical modeling of drug release kinetics” above, when pure diffusion is the controlling release mechanism, the exponent n is equal to 0.5.

When n takes a value of 1.0, the drug release rate is independent of time, corresponding to zero order release kinetics. It was observed that the values of n of all the formulations were between 0.5 and 1.0, with the lowest value at 0.53 for F15 and the highest value at 0.81 for F10. This observation indicated the superposition of diffusion and relaxation phenomena, which is also called anomalous transport. The n values of Satiaxane formulations, which were found between 0.53 and 0.65, suggested the diffusion became a more important mechanism for these formulations.

Based on Korsmeyer-Peppas law, the times for 25, 50, and 80% of total released amount were also calculated and the average values are shown in Table 6. The results suggested that when used singly, P407 had a weak ability to retain SS both for 18% and 19% concentrations. Approximately 80% of SS were already released after 35 min. The shortest time for 25% release of drug was found for F7 to be about 4.6 minutes, suggesting a slight burst effect when applying P188. The highest values were seen with the Satiaxane formulations, indicating the release was sustained from the initial period of drug release. Generally, F6 (P407 18%/NaCl 2%) exhibited the fastest release, while the longest release was obtained with 0.1% of Satiaxane and reached 73.5 minutes for the T_{80} . Based on these results, four formulations showed potential interest: F4 (P407 18%/Satiaxane 0.1%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%), F12 (P407 19%/Satiaxane 0.1%) and F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%).

The percentage contributions of diffusion and polymer relaxation (erosion) of prepared formulations were obtained from equations 6 and 7, and shown graphically in Fig. 6. In the case of P407 18% formulation (F2), Fickian diffusion predominated for the first 20 minutes, then gradually decreased until erosion became predominant in the rest time. The addition of NaCl 1% (F5) exhibited an increase in the erosion contribution from the initial release period. It was found that the erosion became more important than diffusion from about 10 minutes of release (Fig. 6b). This observation confirmed the osmotic effect hypothesis. In the case of P188 (F7), which accelerated the drug release like NaCl, but diffusion interestingly remained the predominant mechanism for about 50 minutes (Fig. 6c). These observations showed the different monitors of drug release enhancement. On the other hand, as can be seen in Fig 6d, with Satiaxane, the erosion contribution remained relatively small while the diffusion was the predominant mechanism for the entire dissolution time period. This finding confirmed the formation of a resistant matrix by Satiaxane. However, as the concentration of Satiaxane increased from 0.05% to 0.1%, the contribution of erosion became more important, even though the diffusion remained higher. It is suggested that the increase on Satiaxane

concentration decreased the permeability of the hydrogel. The application of these equations not only helped investigate the evolution of each mechanism with time, but also clearly indicated the drug release monitoring.

Table 5

Mathematical model fitting of drug release data

Formulation	Mathematic model						
	Higuchi	0	Korsmeyer-Peppas		Peppas-Sahlin 2		
		order					
	R^2_{adjusted}		R^2_{adjusted}	n	K_{kp}	R^2_{adjusted}	K_1/K_2
F2 (P407 18%)	0.934	0.947	0.990	0.75	5.65	0.986	4.66
F3 (P407 18%/Satiaxane 0.05%)	0.971	0.723	0.974	0.56	8.85	0.970	70.04
F4 (P407 18%/Satiaxane 0.1%)	0.955	0.861	0.987	0.65	5.47	0.982	15.05
F5 (P407 18%/NaCl 1%)	0.937	0.971	0.994	0.78	5.64	0.992	3.13
F6 (P407 18%/NaCl 2%)	0.944	0.966	0.992	0.77	7.28	0.989	3.41
F7 (P407 18%/P188 1%)	0.974	0.940	0.997	0.68	8.96	0.997	7.25
F8 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.05%)	0.959	0.853	0.972	0.62	6.76	0.966	23.62
F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	0.955	0.914	0.986	0.70	4.29	0.985	11.52
F10 (P407 19%)	0.903	0.958	0.980	0.81	4.53	0.974	2.80
F11 (P407 19%/Satiaxane 0.05%)	0.973	0.741	0.977	0.56	8.44	0.974	52.48
F12 (P407 19%/Satiaxane 0.1%)	0.973	0.822	0.992	0.61	6.01	0.989	22.86
F13 (P407 19%/NaCl 1%)	0.939	0.980	0.998	0.80	5.92	0.997	2.51
F14 (P407 19%/P188 1%)	0.961	0.932	0.990	0.69	6.86	0.990	7.85
F15 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%)	0.972	0.680	0.971	0.53	9.84	0.969	189.16
F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	0.967	0.864	0.997	0.64	5.03	0.996	15.45

R^2_{adjusted} : adjusted coefficient of determination,

K_{kp} : release constant in Korsmeyer-Peppas model, n: release exponent indicating the drug release mechanism,

K_1 : constant related to the Fickian kinetics, K_2 : constant related to Case-II relaxation kinetic.

Table 6

Times for 25%, 50% and 80% drug released (n=3)

Formulations	Drug release time (min)		
	T ₂₅	T ₅₀	T ₈₀
F2 (P407 18%)	7.3	18.3	34.3
F3 (P407 18%/Satiaxane 0.05%)	6.5	22.6	52.5
F4 (P407 18%/Satiaxane 0.1%)	10.3	30.0	61.8
F5 (P407 18%/NaCl 1%)	6.7	16.2	29.4
F6 (P407 18%/NaCl 2%)	5.0	12.4	22.8
F7 (P407 18%/P188 1%)	4.6	12.7	25.5
F8 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.05%)	8.4	25.8	55.4
F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	12.6	34.2	67.3
F10 (P407 19%)	8.3	19.7	35.4
F11 (P407 19%/Satiaxane 0.05%)	6.9	23.4	53.9
F12 (P407 19%/Satiaxane 0.1%)	10.3	31.9	68.8
F13 (P407 19%/NaCl 1%)	6.0	14.2	25.6
F14 (P407 19%/P188 1%)	6.5	17.8	35.2
F15 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%)	5.7	21.0	50.7
F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	12.1	35.4	73.5

3.4.2. Effect of formulation evaluated using the semisolid adaptor (SSA)

At the surface of buccal mucus membrane, the release of the drug is mainly controlled by diffusion: the drug diffuses through the hydrogel matrix formed by the gelation. To prevent the dissolution of the hydrogel and establish a relatively absolute diffusion condition, the adaptor for semisolid forms (SSA) with an acetate cellulose membrane (0.45 μm) was also used in our study. The drug release profiles and the effect of each component on drug release were investigated. As shown in Fig. 7a, the effect of P407 concentration was more pronounced in this diffusion condition when compared with the profiles obtained in the test using the standard cell (Fig. 4): the drug release rate decreased as the P407 concentration increased. An explanation for this observation is the elevated number of micelles at higher P407 concentrations, resulting in a more entangled and less permeable system. It was known that diffusivity was related to the microviscosity and hydrophilicity of the aqueous channels in the gel matrix rather than to the bulk viscosity (Zhang et al., 2002), so when preventing or lightening the dissolution phenomenon, the effect of increasing P407 concentration became

more discriminant. However, as to NaCl, the difference was found less distinct (Fig. 7b) compared with the standard cell method. Moreover, a slight decrease of release rate was observed, because a tighter network was formed when salt was added (Choi et al., 1999; Ricci et al., 2005). In the case of P188, as shown in Fig. 7c, the drug release was more rapid compared to the simple P407 gel. Additionally, a significant initial burst effect could be observed and this phenomenon was also present in standard cell experiments, confirming the modification of the gel network structure by incorporating P188, which facilitates the diffusion. Fig. 8 showed the effect of Satiaxane. As previously mentioned, the erosion phenomena was minimized in the SSA model, drug diffusion through the aqueous channels of gel, rather than gel dissolution, controls the release rate. Consequently, only Higuchi model was used to exploit the data (Pandit and Kisaka, 1996), the values of different parameters are shown in Table 7. The T_{80} reached 97.8 minutes for F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%) compared to 73.5 minutes obtained in the standard flow through cell. However, the initial drug release was found accelerated owing to the presence of P188 (T_{25} = 9.6 min). This might be interesting for acute asthma treatment.

Table 7

Drug release kinetic parameters from Higuchi modeling for the data obtained in SSA essay (n=3)

Formulations	Higuchi			
	K_h	T_{25} (min)	T_{50} (min)	T_{80} (min)
F4 (P407 18%/Satiaxane 0.1%)	8.78	8.1	32.5	83.1
F9 (P40718%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	10.72	5.4	21.8	55.7
F12 (P407 19%/Satiaxane 0.1%)	6.88	13.2	52.8	135.2
F16 (P40719%/P188 1%/Satiaxane 0.1%)	8.10	9.6	38.2	97.8

Generally, drug release can be affected by the viscosity of the gel, the network structure, the distribution of the drug between the micelles and the aqueous phase, and even the osmotic pressure. Since the charged water-soluble molecules are not expected to enter the hydrophobic core of the poloxamer micelles, we believe the SS in our hydrogel is located in the outer aqueous region rather than inside the micelles. Thus, a change in SS release is expected to reflect a change in the viscosity or the rearrangement of the micelles, so in the PEO region. As can be seen in the thermal and micellization analyses, P188 can shift the

gelation and micellization temperatures and the gelation time to a higher value, while the effect on gelation temperature was found to be more important, which indicates its influence on micelle-micelle interaction. This perhaps can explain the accelerated release of SS from the hydrogel containing P188: the presence of P188 molecules can disrupt the rearrangement of micelles. In the case of NaCl, its effect of reducing both gelation and micellization temperatures was due to its capacity to enhance water polarity and thus reduce the solubility of PPO block and PEO chain. This phenomenon indirectly made the intermicellar interactions stronger and the gel network tighter, which enhanced the mechanic strength of the hydrogels. That is why the drug release was slightly reduced in the release experiments with membrane. However, in the drug release study without membrane, NaCl could accelerate the drug release by increasing the water uptake rate into the hydrogel due to an osmotic effect, thus enhancing the dissolution rate of the gel. The presence of Satiexane in formulations significantly reduced the drug release and altered the release mechanism towards diffusion. This observation confirmed the formation of a mechanical matrix by Satiexane, which could also shift the micellization and gelation properties of poloxamer.

Currently, the synergy between xanthan gum and poloxamer has attracted some researchers but many of them focused on the ophthalmic drug delivery system (Bhowmik et al., 2013; Shastri et al., 2010). For the buccal drug delivery, as the patches and films may require high technology and long preparing procedure, the mucoadhesive hydrogel seems to be an interesting vehicle. Additionally, owing to the thermosensitive property of poloxamer, its administration to the site is easier and more convenient. Once introduced in the buccal cavity, the hydrogel adheres to the buccal mucosa but also encounters an aqueous environment with a constant flow of saliva. That is why it was necessary to use and compare two techniques with and without membrane to understand the release of SS from the hydrogels.

4. Conclusion

This study described the effects of formulation on the thermogelation, micellization, mechanical properties and drug release profile of the hydrogels based on poloxamer 407. The overall results helped, not only understand the poloxamer hydrogels' behaviors, but also select the potential formulations for buccal release of salbutamol. Firstly, the fact that the P407 reduces and P188 raises the sol-gel transition temperature conducted us to set their concentrations to 18-19% and 1%, respectively. P188 affected slightly the gel strength but accelerated the drug release, and mainly the drug diffusion, possibly by disturbing the P407

micelle rearrangement. With the addition of NaCl, the micellization and sol-gel transition temperatures were reduced while the gel strength increased. Interestingly, the drug release enhanced by NaCl was due to the more erodible property of the gel by osmotic effect. We have demonstrated that incorporating either 0.05% or 0.1% Satiaxane into the P407/P188 formulation could reduce the drug release rate by making diffusion the predominant mechanism. Although their gel strength was increased, the hydrogels with Satiaxane remained fluid at room temperature and kept their thermosensitive properties. In conclusion, the formulations containing NaCl would not be suitable for further application due to their low gelation temperature and fast dissolution performance. The combination of P407, P188 and xanthan gum provided not only an optimal sol-gel transition temperature, but also an enhanced gel strength, which also sustained drug release even with an initial burst effect in the presence of P188. These provided potential clinic interests. Three formulations seemed to be optimal: F4 (P407 18%/Satiaxane 0.1%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%), and F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%). The developed *in vitro* drug release study with two methods (with and without membrane) allowed us to carry out a more complete investigation. The mathematical models, in particular the diffusion/erosion contribution model, helped understanding of the gel structure modification by each component. Further evaluations of mucoadhesion capacity of the hydrogels *in vitro* and *in vivo* are currently ongoing.

Acknowledgements

The authors would like to thank the laboratory MSC of University Paris Diderot, in particular Dr Imane Boucenna, for her technical support. The authors also wish to thank SPS Pharma Services for providing Sotax USP4 apparatus.

References

- Alexandridis, P.; Alan Hatton, T., 1995. Poly(ethylene Oxide) poly(propylene Oxide) poly(ethylene Oxide) Block Copolymer Surfactants in Aqueous Solutions and at Interfaces: Thermodynamics, Structure, Dynamics, and Modeling. *Colloids. and. Surfaces. A.* 96, 1–46.
- ASTHME [WWW Document], n.d. Man. Merck. URL http://mm.msdfrance.com/manuel_merck/06pula31.html (accessed 2.13.13).
- Baloğlu, E.; Karavana, S. Y.; Hyusein, I. Y.; Köse, T., 2010. Design and Formulation of Mebeverine HCl Semisolid Formulations for Intraorally Administration. *AAPS. PharmSciTech.* 11, 181–188.
- Baloglu, E., Karavana, S.Y., Senyigit, Z.A., Hilmioglu-Polat, S., Metin, D.Y., Zekioglu, O., Guneri, T., Jones, D.S., 2011. In-situ gel formulations of econazole nitrate: preparation and in-vitro and in-vivo evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1274–1282.
- Bernstein, G., 2008. Delivery of insulin to the buccal mucosa utilizing the RapidMist™ system. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5, 1047–1055.
- Bhowmik, M., Kumari, P., Sarkar, G., Bain, M.K., Bhowmick, B., Mollick, M.M.R., Mondal, D., Maity, D., Rana, D., Bhattacharjee, D., Chattopadhyay, D., 2013. Effect of xanthan gum and guar gum on in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on poloxamer-407. *Int. J. Biol. Macromol.* 62C, 117–123.
- Bonacucina, G., Spina, M., Misici-Falzi, M., Cespi, M., Pucciarelli, S., Angeletti, M., Palmieri, G. F., 2007. Effect of Hydroxypropyl Beta-cyclodextrin on the Self-assembling and Thermogelation Properties of Poloxamer 407. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32, 115–122.
- Boulton, D.W., Fawcett, J.P., 2001. The pharmacokinetics of levosalbutamol: what are the clinical implications? *Clin. Pharmacokinet.* 40, 23–40.
- BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE [WWW Document], n.d. Man. Merck. URL http://mm.msd-france.com/manuel_merck/06pula32.html (accessed 2.13.13).
- Ceulemans, J., Vinckier, I., Ludwig, A., 2002. The Use of Xanthan Gum in an Ophthalmic Liquid Dosage Form: Rheological Characterization of the Interaction with Mucin. *J. Pharm. Sci.* 91, 1117–1127.
- Chang, J.Y., Oh, Y.K., Choi, H., Kim, Y.B., Kim, C.-K., 2002. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *Int. J. Pharm.* 241, 155–163.
- Chen, C.-C., Fang, C.-L., Al-Suwayeh, S. A., Leu, Y.-L., Fang, J.-Y., 2011. Transdermal Delivery of Selegiline from alginate–Pluronic Composite Thermogels. *Int. J. Pharm.* 415, 119–128.
- Chen, J., Zhou, R., Li, L., Li, B., Zhang, X., Su, J., 2013. Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/ poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. *Mol. Basel Switz.* 18, 12415–12425.
- Chinna Reddy, P., Chaitanya, K.S.C., Madhusudan Rao, Y., 2011. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. *DARU J. Pharm. Sci.* 19, 385–403.
- Choi, H.; Lee, M.; Kim, M.; Kim, C., 1999. Effect of Additives on the Physicochemical Properties of Liquid Suppository Bases. *Int. J. Pharm.* 190, 13–19.
- Costa, P.; Sousa Lobo, J. M., 2001. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133.

- Dumortier, G., El Kateb, N., Sahli, M., Kedjar, S., Boulliat, A., Chaumeil, J. C., 2006. Development of a Thermogelling Ophthalmic Formulation of Cysteine. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 32, 63–72.
- Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C., 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728.
- Dumortier, G.; Zuber, M.; Barges, N.; Chast, F.; Dutertre, H.; Chaumeil, J. C., 1994 Lacrimal and Plasmatic Kinetics of Morphine After an Ophthalmic Delivery of Three Different Formulations. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 20, 1147–1158.
- Goldstein, D.A., Tan, Y.K., Soldin, S.J., 1987. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of salbutamol in healthy adult volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 32, 631–634.
- Hao, J., Heng, P.W.S., 2003. Buccal Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, 821–832.
- Hsu, S.-H., Leu, Y.-L., Hu, J.-W., Fang, J.-Y., 2009. Physicochemical characterization and drug release of thermosensitive hydrogels composed of a hyaluronic acid/pluronic f127 graft. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 57, 453–458.
- Imboden, R., Imanidis, G., 1999. Effect of the amphoteric properties of salbutamol on its release rate through a polypropylene control membrane. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 161–167.
- Koffi, A. A., Agnely, F., Ponchel, G., Grossiord, J. L., 2006. Modulation of the Rheological and Mucoadhesive Properties of Thermosensitive Poloxamer-based Hydrogels Intended for the Rectal Administration of Quinine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 328–335.
- Mälkki-Laine, L., Purra, K., Kähkönen, K., Tammilehto, S., 1995. Decomposition of Salbutamol in Aqueous Solutions. II. The Effect of Buffer Species, pH, Buffer Concentration and Antioxidants. *Int. J. Pharm.* 117, 189–195.
- McInnes, F., Clear, N., James, G., Stevens, H.N.E., Vivanco, U., Humphrey, M., 2008. Evaluation of the Clearance of a Sublingual Buprenorphine Spray in the Beagle Dog Using Gamma Scintigraphy. *Pharm. Res.* 25, 869–874.
- Moore, T., Croy, S., Mallapragada, S., Pandit, N., 2000. Experimental Investigation and Mathematical Modeling of Pluronic® F127 Gel Dissolution: Drug Release in Stirred Systems. *J. Control. Release.* 67, 191–202.
- Morgan, D. J., Paull, J. D., Richmond, B. H., Wilson-Evered, E., Ziccone, S. P., 1986. Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Salbutamol and Its Sulphate Conjugate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22, 587–593.
- Murtaza, G., Ahmad, M., Akhtar, N., 2009. Biowaiver study of oral tableted ethylcellulose microcapsules of a BCS class I drug. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 23.
- Nie, S., Hsiao, W. W., Pan, W., Yang, Z., 2011. Thermoreversible Pluronic® F127-based Hydrogel Containing Liposomes for the Controlled Delivery of Paclitaxel: In Vitro Drug Release, Cell Cytotoxicity, and Uptake Studies. *Int. J. Nanomedicine.* 6, 151–166.
- Pandit, N. K., Kisaka, J., 1996. Loss of Gelation Ability of Pluronic® F127 in the Presence of Some Salts. *Int. J. Pharm.* 145, 129–136.
- Pandit, N. K.; Wang, D., 1998. Salt Effects on the Diffusion and Release Rate of Propranolol from Poloxamer 407 Gels. *Int. J. Pharm.* 167, 183–189.
- Patel, R. S., Poddar, S. S., 2009. Development and Characterization of Mucoadhesive Buccal Patches of Salbutamol Sulphate. *Curr. Drug. Deliv.* 6, 140–144.

- Peppas, N. A., Sahlin, J. J., 1989. A Simple Equation for the Description of Solute Release. III. Coupling of Diffusion and Relaxation. *Int. J. Pharm.* 57, 169–172.
- Qi, H., Chen, W., Huang, C., Li, L., Chen, C., Li, W., Wu, C., 2007. Development of a Poloxamer Analogs/carbopol-based in Situ Gelling and Mucoadhesive Ophthalmic Delivery System for Puerarin. *Int. J. Pharm.* 337, 178–187.
- Ricci, E. J., Lunardi, L. O., Nanclares, D. M. A., Marchetti, J. M., 2005. Sustained Release of Lidocaine from Poloxamer 407 Gels. *Int. J. Pharm.* 288, 235–244.
- Rowe, R., Sheskey, P., Owen, S., 2005. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed. London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA.
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Del Fante, C., Perotti, C., Gallanti, A., Caramella, C., 2011. An in Situ Gelling Buccal Spray Containing Platelet Lysate for the Treatment of Oral Mucositis. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 8, 277–285.
- Schmolka, I. R., 1972. Artificial Skin I. Preparation and Properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment of Burns. *J. Biomed. Mater. Res.* 6, 571–582.
- Schmolka, I. R., 1994. Physical Basis for Poloxamer Interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 720, 92–97.
- Shastri, D. H., Prajapati, S. T., Patel, L. D., 2010. Thermoreversible Mucoadhesive Ophthalmic in Situ Hydrogel: Design and Optimization Using a Combination of Polymers. *Acta. Pharm.* 60, 349–360.
- Shastri, D. H., Prajapati, S. T., Patel, L. D., 2010. Design and Development of Thermoreversible Ophthalmic In Situ Hydrogel of Moxifloxacin HCl. *Curr. Drug. Deliv.*
- Singh, S., Soni, R., Rawat, M.K., Jain, A., Deshpande, S.B., Deshpande, S.B., Singh, S.K., Muthu, M.S., 2010. In vitro and in vivo evaluation of buccal bioadhesive films containing salbutamol sulphate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 58, 307–311.
- Singh, V., Khullar, P., Dave, P.N., Kaur, N., 2013. Micelles, mixed micelles, and applications of polyoxypropylene (PPO)-polyoxyethylene (PEO)-polyoxypropylene (PPO) triblock polymers. *Int. J. Ind. Chem.* 4, 1–18.
- Su, Y.-L., Wei, X.-F., Liu, H.-Z., 2003. Effect of Sodium Chloride on Association Behavior of Poly(ethylene Oxide)-poly(propylene Oxide)-poly(ethylene Oxide) Block Copolymer in Aqueous Solutions. *J. Colloid. Interface. Sci.* 264, 526–531.
- Ur-Rehman, T., Tavelin, S., Gröbner, G., 2010. Effect of DMSO on Micellization, Gelation and Drug Release Profile of Poloxamer 407. *Int. J. Pharm.* 394, 92–98.
- Ur-Rehman, T., Tavelin, S., Gröbner, G., 2011. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 409, 19–29.
- USP - NF, 2013. . Dissolution.
- USP 36-NF 31: (1724) Semisolid drug products-Performance tests, 2013.
- Vadnere, M., Amidon, G., Lindenbaum, S., Haslam, J. L., 1984. Thermodynamic Studies on the Gel-sol Transition of Some Pluronic Polyols. *Int. J. Pharm.* 22, 207–218.
- Vasanth, P. V., Puratchikody, A., Mathew, S. T., Balaraman, A. K., 2011. Development and Characterization of Eudragit Based Mucoadhesive Buccal Patches of Salbutamol Sulfate. *Saudi. Pharm. J.* 19, 207–214.

- Vermani, K., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., 2002. Assemblies for in Vitro Measurement of Bioadhesive Strength and Retention Characteristics in Simulated Vaginal Environment. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 28, 1133–1146.
- Xuan, J.-J., Yan, Y.-D., Oh, D. H., Choi, Y. K., Yong, C. S., Choi, H.-G., 2011. Development of Thermo-sensitive Injectable Hydrogel with Sustained Release of Doxorubicin: Rheological Characterization and in Vivo Evaluation in Rats. *Drug. Deliv.* 18, 305–311.
- Zhang, L., Parsons, D. L., Navarre, C., Kompella, U. B., 2002. Development and In-vitro Evaluation of Sustained Release Poloxamer 407 (P407) Gel Formulations of Ceftiofur. *J. Control. Release.* 85, 73–81.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S., 2010. DDSolver: An Add-in Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS. J.* 12, 263–271.

Figures

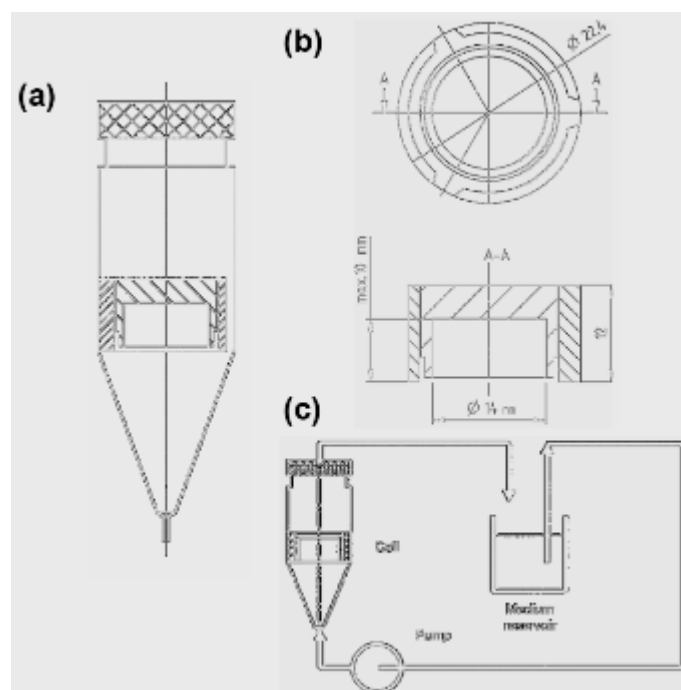


Fig.1. The adapter (SSA) for semisolid dosage forms in USP Apparatus 4. (a) Vertical positioning of SSA in the standard cell of 22.6 mm. (b) Geometric parameters of SSA. (c) Closed system configuration.

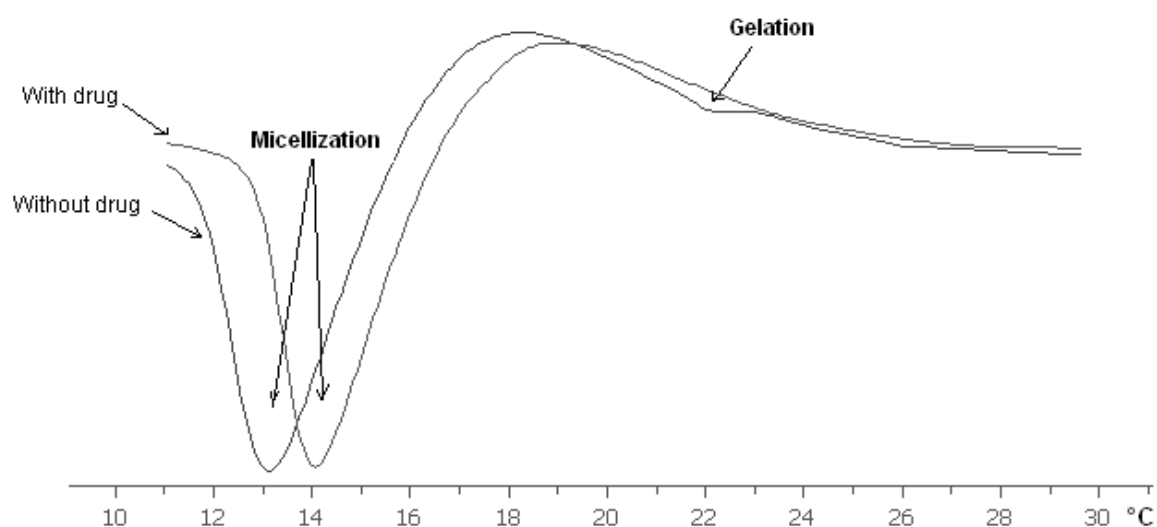


Fig.2. Derivative DSC thermogram of poloxamer hydrogels (F2: P407 18%) with and without drug (SS, salbutamol sulphate).

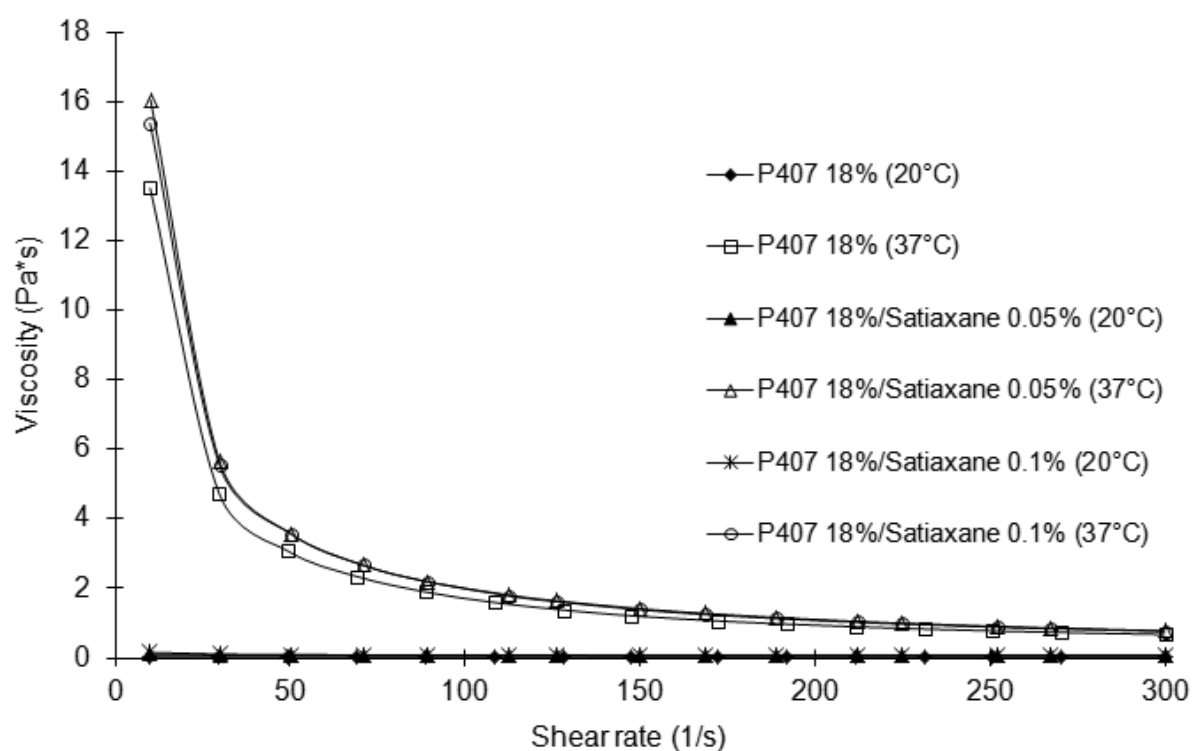


Fig.3. Apparent viscosity determined at the shear rate rang 10-300 s^{-1} of different formulations at 20°C and 37°C.

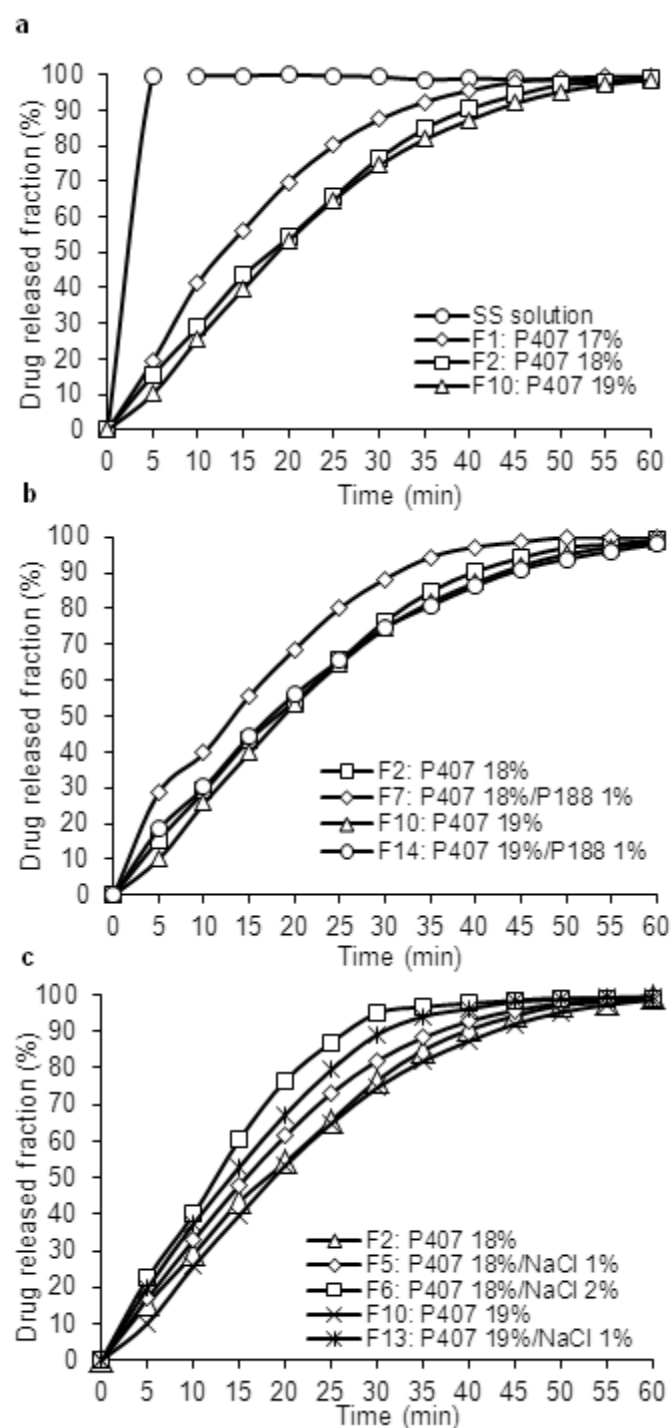


Fig.4. *In vitro* SS (salbutamol) release profiles from various hydrogels, using the USP4 standard flow through cell. (a) Effect of P407 concentration. (b) Effect of P188. (c) Effect of NaCl. The mean values of 3 tests are represented.

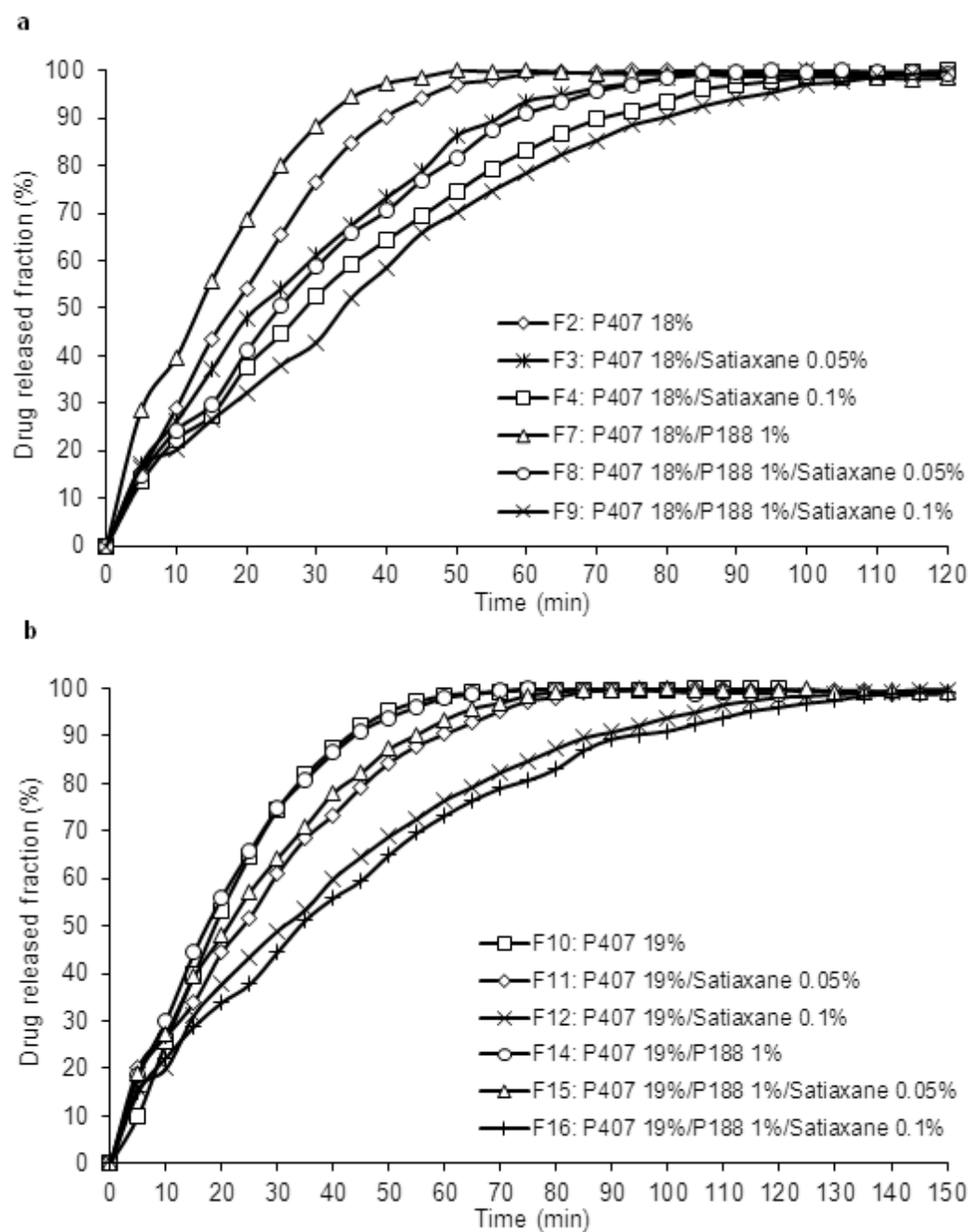


Fig.5. *In vitro* SS (salbutamol) release profiles using the USP4 standard cell: effect of Satiaxane. (a) Hydrogels of P407 18%. (b) Hydrogels of P407 19%. The mean values of 3 tests are represented.

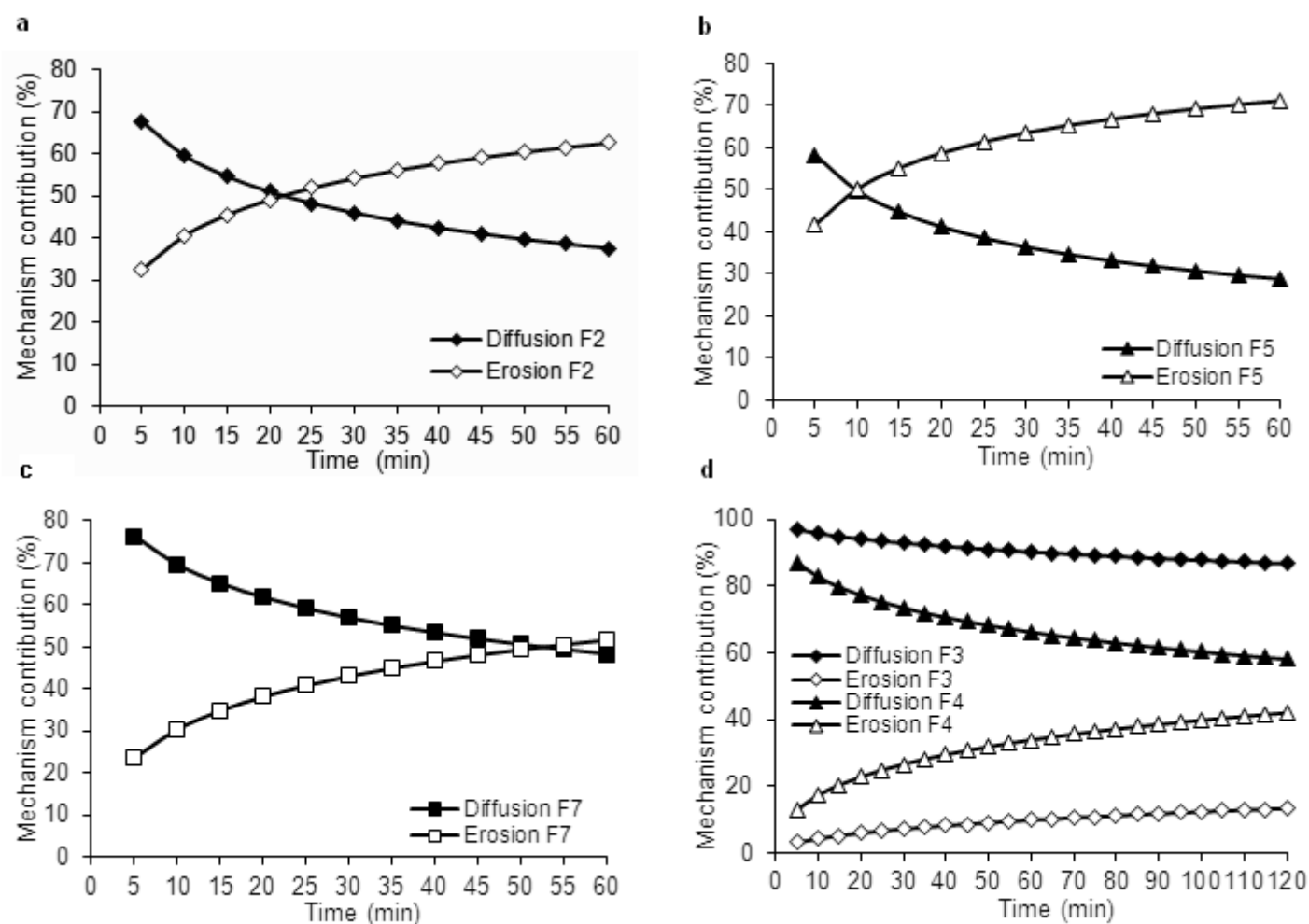


Fig.6. Percentage of diffusion and erosion contributions as a function of time. (a) F2: P407 18%. (b) F5: P407 18%/NaCl 1%. (c) F7: P407 18%/P188 1%. (d) F3: P407 18%/Satiexane 0.05%, F4: P407 18%/Satiexane 0.1%. The mean values (n=3) are represented.

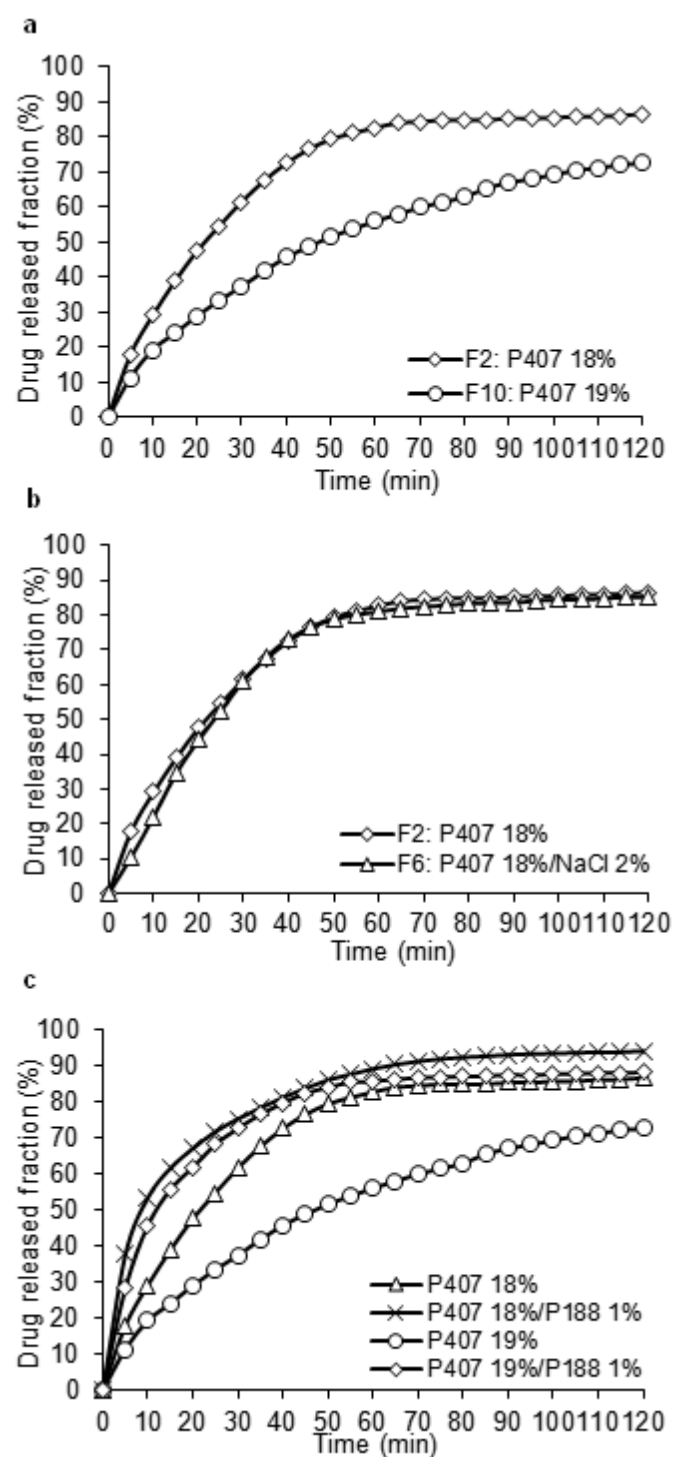


Fig.7. *In vitro* SS (salbutamol) release profiles from various hydrogels using the semisolid adaptor (SSA) (a) Effect of P407 concentration. (b) Effect of NaCl. (c) Effect of P188. The mean values (n=3) are represented.

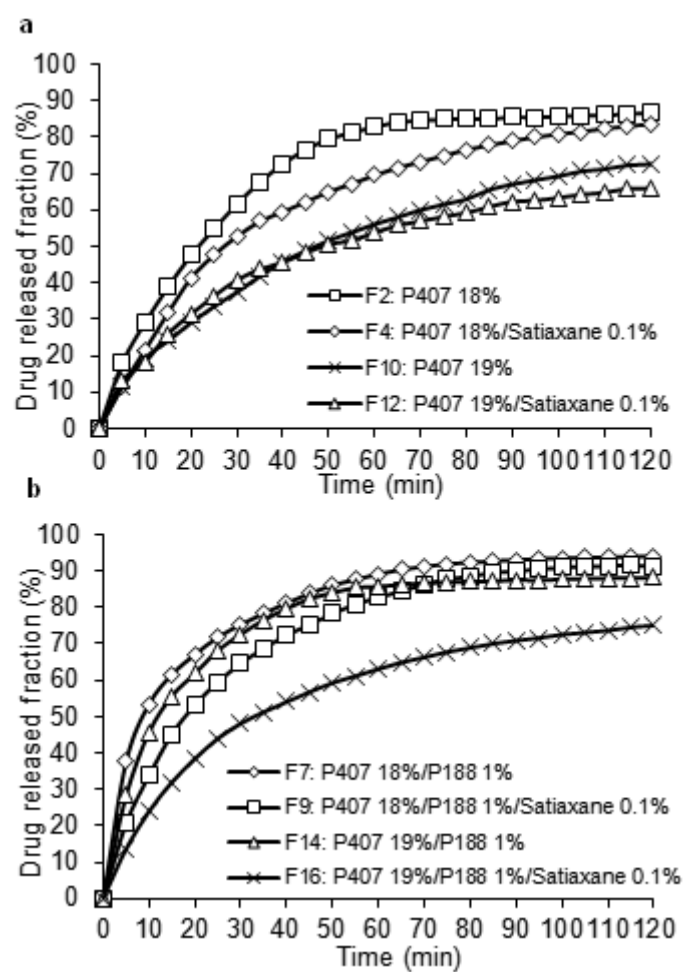


Fig.8. *In vitro* SS release profiles from various hydrogels using the semisolid adaptor (SSA): effect of Satiaxane. (a) Effect of F4 and F12. (b) Effect of F9 and F16. The mean values (n=3) are represented.

Article 2: Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line

Ni Zeng, Nathalie Mignet, Gilles Dumortier, Elodie Olivier, Johanne Seguin, Marc Maury, Daniel Scherman, Patrice Rat, Vincent Boudy

Soumis au journal Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine

Abstract

A salbutamol sulfate (SS)-Poloxamer bioadhesive hydrogel specially developed for buccal administration was investigated by studying interactions with TR146 human buccal epithelium cells (i.e. cellular toxicity (i) and trans-epithelial SS diffusion (ii)). The assessment of cell viability (MTT, Alamar Blue), membrane integrity (Neutral Red), and apoptosis assay (Hoechst 33342), were performed and associated to Digital Holographic Microscopy analysis. After single treatment, SS solution induced drastic cellular alterations that were prevented by hydrogels in relation with the concentrations of poloxamer and xanthan gum. The formulation containing P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1% showed the best tolerance after single and multiple administrations and significantly reduced the trans-epithelial permeability from $5.00 \pm 0.29 (\times 10^3)$ (SS solution) to 1.83 ± 0.22 cm/h. Digital Holographic Microscopy images in good agreement with the viability data confirmed the great interest of this direct technique. In conclusion, the proposed hydrogels represent a safe and efficient buccal drug delivery platform.

Key words: Pluronic, Xanthan gum, Buccal tolerance, Necrosis, Apoptosis

Background

By avoiding hepatic first pass metabolism and the possible enzymatic or acid degradation of drugs in the gastrointestinal tract (GI), the buccal mucosa represents an attractive site for both systemic and local treatment. Accordingly, the delivery of drugs to the oral cavity has attracted particular attention, due to improved patient compliance as compared to parenteral administration by injection or to oral administration, especially in pediatric and geriatric applications.^{1,2} Besides, the formulations can be removed easily if therapy is required to be discontinued.

In our previous study,³ a series of thermosensitive hydrogels have been developed for the buccal delivery of salbutamol sulfate (SS). As a short-acting *beta*-2 adrenoceptor agonist, SS is widely used in the treatment of reactive airways diseases such as asthmatic disorders and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD). The hydrogels are based on a mixture of poloxamer analogs and xanthan gum, which present a synergy of thermosensitive and mucoadhesive properties. Poloxamers, are triblock copolymers of PEO-PPO-PEO (polyethyleneoxy-polypropyleneoxy-polyethyleneoxy), which self-assemble as micelles in solution.⁴ The gelation is a result of inter-micellar entanglement and packing when temperature increases.⁵ In our previous study, two water soluble poloxamers of different PEO/PPO ratios: P407, P188 were used to prepare the thermosensitive base. Satiaxane (xanthan gum) was added to obtain suitable mechanical and mucoadhesive properties. The previous results showed that the combination of P407, P188 and xanthan gum provided not only an optimal sol-gel transition temperature, but also an increased gel strength, which sustained drug release, thus providing potential useful clinic interests.

The formulations containing Satiaxane are intended to contact the buccal epithelium for hours. However, the developed formulations are acidified to a pH value of 3.5 in order to maintain the chemical stability of the salbutamol molecule.⁶ Consequently, the local toxicity and irritation evaluation of formulations become an unavoidable issue. Generally, epithelial cell line culture represents a valuable tool for fast and reproducible screening of drug permeability and toxicity, which is widely accepted in industrial pharmaceutical research, e.g., the cell line Caco-2 as a model for intestinal epithelium and the cell line MDCK as a model for kidney epithelial transport mechanisms. The use of human buccal epithelium cell line TR146 has been developed for almost 20 years.⁷ This is a human buccal tumor cell line isolated from neck metastasis. Based on the TR146 cell model, five cytotoxicity assays have been carried out: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay,

Alamar Blue assay, Neutral Red, Hoechst 33342/Propidium Iodide stain and Digital Holographic Microscopy (DHM). The first four assays concern classical and widely used tests, which measure the cell viability or cell apoptosis (Hoechst 33342). The last technique, Digital Holographic Microscopy, is an emerging high resolution imaging technology that offers real time imaging and quantitative measurements of physiological parameters without any staining or labeling of cells, and recently Kühn *et al.* demonstrated its capability for cytotoxicity investigation.⁸

The main aim of our present study was to investigate the local tolerance of Poloxamer based hydrogels with and without acidic drug. In terms of assessment technique, depending on the assay's mechanism and the test compounds, some assays might be more suitable and sensible than others. In this context, another aim of this study was to assess the sensibility of the various assays mentioned above; this also allowed interpreting the results in a complete and reliable way. At the same time, the interest of DHM technique for cytotoxicity evaluation was also substantiated. Finally, the SS trans-epithelial diffusion assessment using filter-grown TR146 stratified cell layers was performed.

Methods

Materials

All the hydrogels were prepared using sterile water Versylene[®] purchased from Fresenius Kabi France (Sèvres, France). Salbutamol sulfate of European Pharmacopoeia grade (molecular weight 576.7) was purchased from Farmalabor SRL (Canosa di Puglia, Italy). Kolliphor[®] P407 and Kolliphor[®] P188 of pharmaceutical use grade were generously offered by BASF (Ludwigshafen, Germany). Satiaxane[®] UCX930 (xanthan gum) was obtained for free from Cargill France (Saint-Germain-en-Laye, France). Sulfuric acid (H₂SO₄) of analytical grade was obtained from VWR International (Fontenay-sous-bois, France).

The cell culture medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose 4.5 g/L, GlutaMAX[™] supplement and pyruvate, was provided by Life Technologies (Saint Aubin, France). Fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA 0.25%, Hank's balanced salt solution (HBSS) and the PBS (phosphate buffered saline) Gibco[®] tablets were also obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France). The reagents MTT, Alamar Blue, Triton[®] X100 and DMSO were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Neutral Red dye was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Hoechst 33342 was provided by Life Technologies (Saint Aubin, France), and Propidium Iodide by

Interchim (Montluçon, France). Isopropanol and HCl 1N were obtained from Carlo-ERBA Reagents (Val de Reuil, France).

Preparation of the poloxamer based hydrogels

Four formulations based on P407, P188 and Satiaxane have been preselected (Table 1). The indicated formulation codes were the same in the previous publication.³ Concentrations of all the components reported here are expressed as weight/volume percentage (% w/v). The Satiaxane (0.05-0.1%) solution was first prepared by dispersing the required amount in a certain volume of sterile water, stirring continuously until complete dissolution. Then the required amount of P407 and P188 were added to the already swollen Satiaxane solution. The preparations were left at 4°C until clear solutions were obtained. Then they were gently homogenized with magnetic stirrers. Sterile water was added to adjust the volume to the total amount when necessary. For the preparations containing active ingredient, SS was added and dissolved last at a concentration of 0.2% (w/v), then the clear and homogeneous preparations were adjusted to a pH value between 3.0 and 3.5 by 0.4 M sulfate acid.⁶ The samples were stored in a refrigerator at 4°C for further study.

Human buccal epithelium cell line culture

TR146 cells were used as testing model in cytotoxicity and trans-epithelial evaluations, because they form undifferentiated, non-keratinized stratified epithelium, sharing many morphological and functional characteristics of normal human buccal mucosa. Previous investigations indicated specific differentiation markers in TR146 cells, in particular, the expression of K4, K10, K13, K16, and K19 keratins, plasma membrane-associated transglutaminase, involucrin and epidermal growth factor receptor, which demonstrated similarities to normal human buccal epithelium.⁹ Besides, activity of aminopeptidase, carboxypeptidase and esterase has also been studied and shown to be comparable with that of human buccal epithelium.¹⁰ The cell line is therefore not only a useful model for absorption studies, but also for metabolic studies with enzymatically labile drugs. Furthermore, various toxicity assays (MTS/PMS, Neutral Red, ATP quantification, LDH and extracellular protein) have been carried out using proliferating TR146 cells and stratified TR146 epithelium.¹¹ The robustness of stratified epithelium was significantly higher than that of proliferating cells.

TR146 cell line was purchased from Cancer Research Technology (London, UK). Since the information on the passage number was not available from the supplier, the obtained passage was designated number one. The culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose 4.5 g/L, GlutaMAXTM supplement and pyruvate. 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS) and 1% (V/V) penicillin and streptomycin were also

supplemented. The TR146 cells were maintained in 75 cm² T-flasks and incubated at 37°C in a 98% relative humidity atmosphere of 5% CO₂/95% air. The culture medium was changed twice a week. At approx. 70-80% confluence, cells were detached from culture flasks (75 cm²) by Trypsin-EDTA 0.25% Gibco® purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). Then the cell dilutions were prepared and seeded in the culture plates and inserts regarding the objectives of the study. The flasks (75 cm²) for cell culture, 6-well and 96-well culture plates were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland).

Cytotoxicity study

Single treatment

The cytotoxicity study was carried out on the proliferating cells. After detachment from the culture flask with trypsin, the cells were suspended and seeded in the 96-well plates with a concentration of 100 000 cells/mL, 200 µL/well. The same cell concentration was adopted in the 6-well plates but with 2 mL per well. After 22-24h culture, the culture medium was removed. In the 96-well plates, four previously selected formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%), F16 (P407 19%/P 1881%/Satiaxane 0.1%) were applied on the cell layer at different volumes (20-100 µL) at 37°C. Then the preheated culture medium (100 µL) at 37°C was carefully added at the surface of the hydrogel to create a biological environment. In order to investigate the effect of P407 concentration (17-21%), the same protocol was also applied for Poloxamer 407 alone, and three volumes were tested: 25, 50, 100 µL. The culture medium was used as negative control, while Triton X100 0.1% was used as a positive control which could cause cell necrosis. In the case of 6-well plate in DHM assay, the tested volume of each formulation was set to 1 mL considering the well's surface, and without culture medium at the gel's surface.

All the plates were incubated for 2h at 37°C. After incubation, the plates were washed twice with HBSS. The “vehicle” formulations without SS having a pH around 6.8 were also tested.

Cell mitochondrial activity assessment: MTT

The MTT assay which depends on cell mitochondrial activity is an index of intrinsic cytotoxicity.¹² For viable cells, mitochondrial succinic dehydrogenase is able to transform the tetrazolium salt to an insoluble purple formazan.¹³ After the hydrogel treatment in the 96-well plates, 100 µL of the MTT reagent (0.5 mg/ml prepared in culture medium) was added in each well and the plates were incubated for 3h. Then the reagent was carefully removed. A volume of 100 µL lysis buffer (10 g Triton X100, 10 mL HCl 1N, qsp 100 mL isopropanol) were

added in each well to dissolve the formazan. After 10-15 min agitation on an orbital shaker, the absorbance at 562 nm was read on a Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter microplate reader provide by Perkin Elmer / Wallac (Massachusetts, US). Cell viability (%; n=3-6) is the ratio of the values of the cells treated with formulations and the values of the control.

Cell metabolic activity assessment: Alamar Blue

Alamar Blue assay is well known as an indicator of cell metabolic state and cell viability in cytotoxicity assessment.¹⁴ In viable cells, the Alamar Blue reagent (resazurin), blue, non-fluorescent, is believed to be reduced to a pink fluorescent dye by many reductases such as NADPH, FADH, FMNH, NADH, as well as the cytochromes located not only in mitochondria, but also in cytoplasm, however the site where the reaction occurs exactly remains unknown.¹⁵ The Alamar Blue solution at 0.1 mg/mL was previously diluted by 1:10 in culture medium. After the single treatment in the 96-well plates, each well was incubated with 200 μ L Alamar Blue reagent for 6 h at 37°C. The fluorescence (λ_{ex} = 535 nm, λ_{em} = 600 nm) was then measured directly with the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) in accordance with the validated protocol.¹⁶ Cell viability (%; n= 6-9) is the ratio between the values observed with the formulation-treated cells versus control cells.

Cell membrane integrity assessment: Neutral Red

Cell membrane integrity was evaluated using Neutral Red dye (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride).¹⁷ The concentrated Neutral Red of 0.4% was first diluted in cell culture medium with a ratio of 1:79, to give a final reagent concentration of 50 μ g/mL. After a centrifugation of 10 min to eliminate the aggregate, Neutral Red was distributed by 200 μ L/well in the plates for an incubation about 3h at 37°C. Then the reagent was removed and the cells were washed once with PBS. A volume of 100 μ L lysis solution based on acetic acid and ethanol was then added in each well in order to extract the dye from the cells. The 96-well plates were agitated by a microplate shaker for 20 min to obtain a homogeneous dying solution in each well. The fluorescence (λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 600 nm) was then measured with the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) according to the validated protocol.¹⁸ The membrane integrity (%; n= 3-6) is expressed as the ratio of the values of the cells treated with formulations and the values of the control.

Cell apoptosis assessment by chromatin condensation: Hoechst 33342

The probe Hoechst 33342 was used to distinguish condensed pycnotic nuclei in apoptotic cells, in combination with Propidium Iodide¹⁹ which penetrates faster in the dead

cells resulting from necrotic process. Hoechst 33342 emits blue fluorescence when it fixes to dsDNA. A 10 µg/mL Hoechst 33342 solution was previously prepared in PBS with 0.05 mg/mL iodide propidium. After the treatment, 200 µL reagent solution was distributed in each well. The plates were kept in the dark for 30 min at room temperature (20°C). Then the fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) was measured in the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) according to the protocol.^{20,21} The results (n = 6-9) were expressed as a ratio of Hoechst / Alamar Blue fluorescence absorbance.

Cell morphology assessment using Digital Holographic Microscopy

The cell morphology observation was carried out with a label-free technique using the digital holographic microscopy (DHM) (HoloMonitor M3, Phase Holographic Imaging AB, PHIAB, Lund, Sweden) equipped with a 20× microscope objective (Olympus, Japan) and also a 10× optical objective (Nikon, Japan). The images were recorded in a six-well plate format.

Repeated treatment

For the repeated treatment, the cells were incubated with the four acidified formulations containing SS for 2 h in the morning and 2 h in the afternoon during two days. Between each treatment, the cells were washed twice with HBSS and immediately incubated with culture medium at 37°C. In this study, MTT was chosen as the cytotoxicity assay. The formulations were tested in various volumes: 25, 50, 100 µL. Each volume was tested in six different wells.

Drug trans-epithelial diffusion study

The drug trans-epithelial permeation study was performed on the stratified epithelium formed by TR146 cells.⁹ The SS solution and the four formulations were tested. The Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts (pore diameter 0.4µm, growth area 1.12 cm²) which were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), were used to culture TR146 cells for 28-30 days.²² The apical side and basolateral side were filled with 0.5 and 1.5 ml culture medium. And the culture medium was changed twice a week. On the day of study, the culture medium was removed. A volume of 200 µL hydrogel was first placed in the insert, then supplemented with 200 µL preheated culture medium at surface. This was considered as the donor part. The receptor part consisted of 1.5 mL PBS. Six sampling of 100 µL from the receptor media were carried out at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4h. Before each sampling, the plate was shaken for about 1 min. After the sampling, 100 µL of fresh PBS were added in the receptor side. The permeation experiments were carried out in triplicate. The amount of SS in each sample was calculated according to the standard curve

established at 274 nm using a spectrophotometry. The flux (F) ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$) and apparent permeability coefficient (P_{app}) (cm/h) were also calculated.

$$F = \frac{dQ}{dt \times A} \quad \text{Equation 1}$$

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt \times A \times C_0} \quad \text{Equation 2}$$

Where dQ/dt is the rate of drug permeation, A is the insert area, and C_0 is the initial drug concentration in the donor media.

At the end of this study, the inserts were washed twice with HBSS, the MTT viability assay was carried out in order to investigate the cell's functional state after the permeation assay.²³ The inserts incubated with culture medium for 4 h were used as negative control ($n=3$). The same protocol as described in chapter 2.4.1.1 was applied.

Image analysis

The optical and DHM images were analysed using Image J and also an open-source software called CellProfiler.²⁴ The CellProfiler software helps to process images, identify objects and measure various object parameters such as size and shape.²⁵ To achieve a better analysis, several modules (treatment) have been applied: a) all images were first cropped to have a desirable size; b) to identify an object, the threshold strategy could be Automatic, Global with Robust Background method, or Global with MoG method: it varied according to the image's illumination quality. The thresholding and smoothing parameters were empirically set to optimize the identification and quantification.

Statistical analysis

The significance between cell viability values was analyzed compared to the negative control using one way ANOVA approach and Dunnett's Test ($p < 0.05$) (Statview 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). The relation between sample volume and cell viability was evaluated by Spearman test, the correlation coefficient ρ indicated the correlation strength (values between 0 and 1). When the absolute value of ρ was found between 0.5 and 1, correlation was considered strong; if between 0 and 0.5, the correlation was weak.

Results

Single treatment: Cell viability and apoptosis

For the hydrogel formulations without SS which presented a pH value about 6.8, none of the assays showed that the hydrogels based on Poloxamer and Satiaxane had an impact on the cell viability, which remained above 80%. In the MTT assay (Figure 1, A), it was demonstrated that increasing gel volume had not effect on cell viability. Especially for F15

and F16, the viability values were not significantly different from negative control ($p > 0.05$). For F8 and F9, except those of 20 and 30 μL , the viability values were not significantly impacted ($p > 0.05$).

However, in the Alamar Blue assays (Figure 1, B), the cell viability increased with the gel volume, reaching a significantly higher percentage as compared to the negative control, in particular for the high volumes (80 and 100 μL) ($p < 0.05$). A similar trend was observed with the Neutral Red assay (Figure 1, C). The cell viability presented a positive correlation to the gel volume, in particular for F16 ($\rho = 0.772$, $p = 0.0002$).

In order to verify or confirm the cell viability protecting effect of P407 which is the major content in the hydrogel, the influence of P407 concentration was evaluated at 17-21% by Alamar Blue assay (Figure 2). Using a volume of 100 μL , the percentages of viable cells at 19 and 21% significantly increased as compared to P407 17% and to the control ($p < 0.05$). These results demonstrated that P407 at the concentration range of 17 to 21% had not toxic effect. Besides, our results confirmed the viability enhancement owing to P407, which had been also observed in the work of Exner et al.²⁶

Concerning the acidified formulations, first, the SS solution at pH 3.5 induced a significant reduction of viability when its volume increased, which was in both MTT and Alamar Blue assays (Figure 3), and there was a high correlation between the tested volume and cell viability ($\rho = -0.715$ for MTT, -0.906 for Alamar Blue, $p < 0.0001$). The lowest cell viability values were $37.6\% \pm 2.2\%$ in MTT, $35.2\% \pm 4.3\%$ in Alamar Blue for the volume 100 μL . While the positive control (Triton X100 treatment) gave a viability of $20.4 \pm 0.2\%$ in MTT assay and $7.4 \pm 0.2\%$ in Alamar Blue assay. This indicated that a necrosis phenomenon was involved when applying an SS acid solution on human buccal epithelium cells. Secondly, Figure 4A and B showed that although acidified, the hydrogel formulations could more or less improve the cell viability as compared to the values observed with SS solution. As for the MTT results, F8 appeared most irritant with an IC_{50} between 30 and 40 μL and high volume impact ($\rho = -0.811$, $p < 0.0001$), while F16 containing more P407 and Satiexane had fewer effects on the cell viability which was always around or above 80%, and with a lower correlation with the volume ($\rho = -0.499$, $p < 0.0001$). The Alamar Blue assay indicated no significant difference between formulations and negative control ($p < 0.05$). The viability and membrane integrity results showed that the hydrogels based on Poloxamer and Satiexane could limit the acid irritant effect and moderate buccal epithelial cell necrosis.

As to the apoptosis chromatin condensation assessment using Hoechst 33342 (Figure 5), we found that SS solution exhibited high apoptosis ratios (Hoechst 33342/Alamar Blue)

for all the tested volumes ($p < 0.0001$). The ratio values of acidified SS formulations were not significantly different from that of negative control, except the volume 100 μ L of F8 and F9. Regarding formulations F15 and F16, no apoptosis was measured in spite of the increasing the gel volume ($p > 0.05$). If we consider all the results in the single treatment, formulations F15 and F16 containing more P407 could significantly decrease the necrosis and apoptosis of human buccal epithelial cells, which were induced by an SS acid solution.

Repeated treatment

Since there was no apparent cytotoxicity of the hydrogel formulations, the repeated exposure was carried out for the formulations containing SS. The MTT assay was chosen in this study because of its sensibility to acidified formulations. The results of repeated treatment presented a good agreement with those of single treatment (Figure 6). Furthermore, the advantage of F16 was here highlighted again. In particular for the lower volumes, F16 with more P407 and Satiaxane showed the highest cell viability, while F8 led to the lowest viability.

Cell morphology assessment by DHM

The images (Figure 7) obtained from optical microscopy and DHM acquisition suggested that this label-free technique, already used to analyse neurons and Hela cells,^{8,27} also provides an interesting alternative to analyse TR146 human epithelial cells morphology. First, the optical images of negative control cells agreed with the images provided by HPA culture collection²⁸, which shared many morphological similarities with normal human epithelial cell. In DHM images, living cells (negative control with cell culture medium) showed an enhanced signal, the contrast appeared higher, and the cell boundaries was neat and clear. While in the Triton treatment (positive toxicity control), the cells became smaller and less intense in the optical and also in the DHM images when compared to the negative control (Figure 7 and Table 2). The area pixel values reduced from $3.53 \pm 1.48 (10^3)$ to $0.68 \pm 0.17 (10^3)$ and the intensity values reduced from $3.66 \pm 1.56 (10^5)$ to $0.64 \pm 0.17 (10^5)$ in optical images' analysis. While in the DHM images, the area values decreased from $1.42 \pm 0.82 (10^3)$ to $0.50 \pm 0.12 (10^3)$, the intensity values from 1.24 ± 0.11 to $0.23 \pm 0.07 (10^5)$. The later suggested a change in cell thickness.

Concerning the SS solution pH 3.5, the cells changed form and lost area when compared to the negative control, and the boundary between cells was hard to be found, especially in the optical images, a cell morphological analysis seemed impossible. It has to be mentioned that the sulphuric acid solution gave the same observation (data not shown). As to the formulation treatment, F16 seemed to have the lowest effect on the cell's morphology,

with the similar optical images and the comparable DHM signal contrast to those of living cells. These microscopy morphology observations were in good agreement with the cell viability results.

Drug trans-epithelial permeation performance

The permeation profiles through Transwell® grown cells had a linear trend and no lag time for all the formulations (Figure 8). This showed a fast absorption of SS through the buccal epithelium layers. Then the hydrogel formulations could significantly sustain the penetration of SS through the stratified TR146 cell layers. The flux reduced from 10.00 ± 0.58 for SS solution to $3.67 \pm 0.44 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$ for F16 (Table 3). This observation was in agreement with our previous *in vitro* dissolution results.³ Besides, at the end of each experiment, the residual drug content in the donor compartment was also analyzed, the sum corresponded to the initial drug amount. In order to make sure that there was no permeability change related to the loss of cell viability and to guarantee the accuracy of this study, MTT assay was carried out at the end of the study. The results (Figure S1) showed that there was no significant difference between the formulations and the negative control ($p < 0.05$).

Discussion

The aim of this study was to investigate on an *in vitro* cellular model the buccal tolerance of our developed Poloxamer hydrogels, by using different methods in order to obtain a reliable and complete interpretation, and to evaluate the drug permeability through the cultured buccal epithelium cell stratified layers. As already discussed in many reviews and research works,^{1,29–31} buccal mucosa offers excellent opportunities for drug delivery system mainly owing to its avoidance of certain drug's degradations by oral route, and its patients' compliance. In order to facilitate the formulation administration and extend its local residence time, we have developed a synergy of *in situ* forming hydrogel and mucoadhesive polymer by mixing Poloxamer analogs P407 and P188, and Satiaxane (xanthan gum). It is necessary to evaluate their local tolerance to buccal mucosa and also the drug trans-epithelial permeation. This toxicological issue has to be assessed, especially for a dosage form which adheres to a biological surface. In the buccal drug delivery system, existing *in vitro* evaluation models include animal buccal tissues and cell cultures.^{32–36} Difficulties in obtaining and conservation animal tissues led to use cell lines as an *in vitro* investigation model. In this context, TR146 cells, which share many biological properties similar to normal buccal epithelial cells, were applied in our study.

In terms of cytotoxicity method screening, the MTT assay seemed to be more sensitive in detecting loss of viability compared to the other tests. However, to evaluate of “vehicle” hydrogels, Alamar Blue and Neutral Red assays were more powerful to demonstrate the volume effect and formulation effect when it was supposed that Poloxamer hydrogels had a cell viability enhancement or protection effect. These observations confirmed the necessity to perform different assays to select the suitable methods. Depending on the cell death mechanism induced by a toxic compound, one method could be more or less sensitive.^{13,17} Even for MTT and Alamar Blue, the two assays which measured the cell metabolic activities, the results could be very different, because the responsible enzyme(s) are different in the two assays.^{12,15} In order to prevent the false positive or negative results induced by enzyme activators or inhibitors, the Neutral Red assay, which estimated cell membrane integrity, provided an additional completing investigation tool. Regarding both Alamar Blue and Neutral Red results, we can confirm that the hydrogels based on Poloxamer 407 not only had no toxicity but even a protective effect. The same observation was discussed in the study of Exner et al.²⁶ They suggested that the toxic effect of poloxamer is related to its value of hydrophilic-lipophilic balance (HLB). Generally, hydrophobic poloxamers which possess relatively longer PPO blocks, performed higher sensitization effect.³⁷ The two Poloxamers used in our formulation P407 and P188 are hydrophilic poloxamers with relatively higher HLB values (22 for P407, 29 for P188). Furthermore, the study of Luo et al.³⁸ has shown that Poloxamer 188 could restore the mitochondrial and lysosomal membrane properties after an *in vitro* traumatic brain injury in cultured primary neurons. According to another study,³⁹ P188 significantly inhibits apoptosis and prevents necrosis. The level of concentration of Poloxamer is another factor which determines its toxic effect. Many studies have suggested that, due to their amphiphilic property, poloxamer copolymers incorporate into cell membranes and enhance drug cytotoxicity in MDR cells,^{40–42} but these effects seemed to be pronounced at a concentration below the critical micellization concentration (CMC), which suggests that the unimer molecules would be responsible for this “detergent-like” effect.

In terms of formulation screening, none of the “vehicle” formulations showed any toxic effect, which suggested the developed hydrogels as a safe drug delivery platform for buccal applications. Besides, we observed that hydrogels could modulate cell necrosis and apoptosis induced by SS acidic solution. Both the single treatment and repeated treatment confirmed the advantage of F16, while F8 was shown less interesting because of its higher irritant effect. Additionally to the concentration effect of P407 as discussed above, another reason could be the different release behaviour of acid from the different hydrogel owing to

the gel viscosity and mechanical properties enhanced by Satiaxane. We have previously shown that Salbutamol was released more slowly from F16 than from F8.³

In our study, DHM examination of cell morphology was developed as a complementary technique to investigate cell viability, demonstrating its potential use in TR146 epithelial cell. To our knowledge, the DHM technique has been introduced in the biological field, in particular for cell morphological examinations, in the last decade.^{43,44} According to the literature, this technique which does not necessitate any labeling, staining or other cell treatment, can be used to identify and analyze cell death, which is related to cell volume changes.^{8,27,45} The DHM signal theoretically depends on both cell thickness and intracellular refractive index, the latter parameter being related to the intracellular content.⁴⁴ Negative and positive controls provided extremely different morphology, and for some “toxic” formulations like F8 and F9, the cell signal and the image contrast were lower, while F16 showed the similar morphology to negative control both in optical and DHM images. The agreement with the cell viability results shows various advantages of the technique: less preparation time compared to cell staining assays, rapidity of detection, and robustness for formulation screening.

Concerning the permeability results, the absence of any lag time phenomenon and the coherence of total drug calculation compared to the initial amount suggested two facts: 1) even administrated in viscous hydrogel forms, SS can be released from the formulations without delay: this rapid drug diffusion in the initial time was already observed in our previous *in vitro* release evaluations;³ 2) after being released from hydrogel, SS molecules can rapidly penetrate across the buccal epithelial stratified cell layers without entrapment in the cells: this corresponded to a two-compartment model.⁴⁶ These observations allowed us to expect an optimal drug bioavailability and clinical interests with these developed formulations. Moreover, the flux and permeability results suggested that the drug absorption rate can be efficiently modulated by the hydrogel formulation, because the cell layer membrane seemed to have no limiting influence on SS permeability. Secondly, the absence of cytotoxicity detected at the end of the dual-chamber experiment confirmed that the drug and formulations caused no damage on buccal stratified epithelium and the results in this study were reliable owing to the maintenance of cell properties.

Conclusion

The use of TR146 cell line is thought to be a good tool to evaluate both the buccal tolerance of our developed Poloxamers/Satiaxane hydrogels and the drug permeability. The absence of toxicity of “vehicle” Poloxamers hydrogel to buccal cell led us to recommend

them as a buccal drug delivery platform. The acidified formulations for SS with more concentrated Poloxamer 407 (19%) and Satiaxane (0.1%) demonstrated a good tolerance, which could significantly modulate the necrosis and apoptosis of the human buccal epithelium cell induced by acidic solution. From a methodological point of view, the application of various cell viability assays (MTT, Alamar Blue), membrane integrity assay (Neutral Red), apoptosis assessment (Hoechst 33342) and morphology observation using DHM technique allowed a complete investigation and interpretation of the results. Besides, the drug trans-epithelial diffusion seemed to have no other limit than that of the formulation. The cell viability enhancement effect of Poloxamer, which depends on its type and concentration, was also confirmed in our study.

Acknowledgements

The authors would like to thank Kersti Alm, Phase Holographic Imaging PHI AB for technical support, helpful advice and data analysis.

References

1. Campisi G, Paderni C, Saccone R, Di Fede O, Wolff A, Giannola LI. Human buccal mucosa as an innovative site of drug delivery. *Curr Pharm Des* 2010;**16**:641-52.
2. Zhang H, Zhang J, Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet* 2002;**41**:661-80.
3. Zeng N, Dumortier G, Maury M, Mignet N, Boudy V. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. *Int J Pharm* 2014;**467**:70-83.
4. Trong LCP, Djabourov M, Ponton A. Mechanisms of micellization and rheology of PEO-PPO-PEO triblock copolymers with various architectures. *J Colloid Interface Sci* 2008;**328**:278-87.
5. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006;**23**:2709-28.
6. Mälkki-Laine L, Purra K, Kähkönen K, Tammilehto S. Decomposition of salbutamol in aqueous solutions. II. The effect of buffer species, pH, buffer concentration and antioxidants. *Int J Pharm* 1995;**117**:189-95.
7. Jacobsen J, van Deurs B, Pedersen M, Rassing MR. TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. *Int J Pharm* 1995;**125**:165-84.
8. Kühn J, Shaffer E, Mena J, Breton B, Parent J, Rappaz B, et al. Label-free cytotoxicity screening assay by digital holographic microscopy. *Assay Drug Dev Technol* 2013;**11**:101-7.

9. Jacobsen J, Nielsen EB, Brøndum-Nielsen K, Christensen ME, Olin HB, Tommerup N, et al. Filter-grown TR146 cells as an in vitro model of human buccal epithelial permeability. *Eur J Oral Sci* 1999;**107**:138-46.
10. Mørck Nielsen H, Rømer Rassing M. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: V. Enzyme activity of the TR146 cell culture model, human buccal epithelium and porcine buccal epithelium, and permeability of leu-enkephalin. *Int J Pharm* 2000;**200**:261-70.
11. Eirheim HU, Bundgaard C, Nielsen HM. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. *Toxicol In Vitro* 2004;**18**:649-57.
12. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 2004;**18**:703-10.
13. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;**160**:171-7.
14. Rampersad SN. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 2012;**12**:12347-60.
15. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem FEBS* 2000;**267**:5421-6.
16. Dutot M, Warnet J-M, Baudouin C, Rat P. Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation. *Eur J Pharm Sci* 2008;**33**:138-45.
17. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005;**288**:369-76.
18. Dutot M, Reveneau E, Pauloin T, Fagon R, Tanter C, Warnet J-M, et al. Multipurpose solutions and contact lens: modulation of cytotoxicity and apoptosis on the ocular surface. *Cornea* 2010;**29**:541-9.
19. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, et al. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994;**17**:59-65.
20. Dutot M, Pouzaud F, Larosche I, Brignole-Baudouin F, Warnet J-M, Rat P. Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;**47**:2812-9.
21. Rat P, Korwin-Zmijowska C, Warnet JM, Adolphe M. New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. *Cell Biol Toxicol* 1994;**10**:329-37.
22. Nielsen HM, Rassing MR. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: III. Permeability enhancement by different pH values, different osmolality values, and bile salts. *Int J Pharm* 1999;**185**:215-25.
23. De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Paderni C, Campisi G, Giannola LI. Evaluation of galantamine transbuccal absorption by reconstituted human oral epithelium and porcine tissue as buccal mucosa models: Part I. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;**70**:869-73.

24. Broad Institute. CellProfiler cell image analysis software [Internet]. [last accessed 28 August 2014];Available from: <http://www.cellprofiler.org/>
25. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 2006;**7**:R100.
26. Exner AA, Krupka TM, Scherrer K, Teets JM. Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers. *J Control Release* 2005;**106**:188-97.
27. Pavillon N, Kühn J, Moratal C, Jourdain P, Depeursinge C, Magistretti PJ, et al. Early Cell Death Detection with Digital Holographic Microscopy. *PLoS ONE* 2012;**7**:e30912.
28. General Cell Collection TR146 [Internet]. [last accessed 22 April 2014];Available from: http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=10032305&collection=ecacc_gc
29. Bernstein G. Delivery of insulin to the buccal mucosa utilizing the RapidMist™ system. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;**5**:1047-55.
30. Hao J, Heng PWS. Buccal delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2003;**29**:821-32.
31. Madhav NVS, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *J Control Release* 2009;**140**:2-11.
32. Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Tripodo C, Florena AM, et al. Release of naltrexone on buccal mucosa: Permeation studies, histological aspects and matrix system design. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;**67**:425-33.
33. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as in vitro model: Effect of biological and experimental variables. *J Pharm Sci* 2010;**99**:1265-77.
34. Mashru R, Sutariya V, Sankalia M, Sankalia J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. *J Pharm Pharm Sci* 2005;**8**:54-62.
35. Oyama Y, Yamano H, Ohkuma A, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Carrier-mediated transport systems for glucose in mucosal cells of the human oral cavity. *J Pharm Sci* 1999;**88**:830-4.
36. Teubl BJ, Absenger M, Fröhlich E, Leitinger G, Zimmer A, Roblegg E. The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal in vitro permeability model. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;**84**:386-93.
37. Batrakova E, Lee S, Li S, Venne A, Alakhov V, Kabanov A. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm Res* 1999;**16**:1373-9.
38. Luo CL, Chen XP, Li LL, Li QQ, Li BX, Xue AM, et al. Poloxamer 188 attenuates in vitro traumatic brain injury-induced mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization damage in cultured primary neurons. *J Neurotrauma* 2013;**30**:597-607.
39. Serbest G, Horwitz J, Jost M, Barbee K. Mechanisms of cell death and neuroprotection by poloxamer 188 after mechanical trauma. *FASEB J* 2006;**20**:308-10.
40. Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* 2008;**130**:98-106.

41. Guo DD, Moon HS, Arote R, Seo JH, Quan JS, Choi YJ, et al. Enhanced anticancer effect of conjugated linoleic acid by conjugation with Pluronic F127 on MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett* 2007;**254**:244-54.
42. Yan F, Zhang C, Zheng Y, Mei L, Tang L, Song C, et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2010;**6**:170-8.
43. Marquet P, Rappaz B, Magistretti PJ, Cuche E, Emery Y, Colomb T, et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt Lett* 2005;**30**:468-70.
44. Rappaz B, Marquet P, Cuche E, Emery Y, Depeursinge C, Magistretti P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Opt Express* 2005;**13**:9361-73.
45. Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, et al. Edaravone Protects against Methylglyoxal-Induced Barrier Damage in Human Brain Endothelial Cells. *PLoS ONE* [Internet] 2014 [last accessed 17 September 2014];**9**:e100152. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100152>
46. Palumbo P, Picchini U, Beck B, van Gelder J, Delbar N, DeGaetano A. A general approach to the apparent permeability index. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2008;**35**:235-48.

Tables

Table 1: Composition of 0.2% salbutamol sulfate formulations (pH 3.0-3.5)

Formulation Code	P407 (%, w/v)	P188 (%, w/v)	Satiaxane [®] (%, w/v)
F8	18	1	0.05
F9	18	1	0.1
F15	19	1	0.05
F16	19	1	0.1

P407: Kolliphor[®] P407; P188: Kolliphor[®] P188; Satiaxane[®]: Xanthan gum

Table 2: Morphology parameters obtained from image analyses by Image J[®]

Formulation	Optical Images		DHM Images	
	Area ($\times 10^3$ pixels)	Intensity ($\times 10^5$)	Area ($\times 10^3$ pixels)	Intensity ($\times 10^5$)
Negative control	3.53 ± 1.48	3.66 ± 1.56	1.42 ± 0.82	1.24 ± 0.11
Positive control	0.68 ± 0.17	0.64 ± 0.17	0.50 ± 0.12	0.23 ± 0.07
SS solution	Not available	Not available	0.73 ± 0.20	0.77 ± 0.26
F8	3.73 ± 1.42	4.18 ± 1.58	1.19 ± 0.30	0.54 ± 0.28
F9	3.87 ± 1.32	4.08 ± 1.35	1.12 ± 0.43	0.36 ± 0.30
F15	3.45 ± 0.91	3.53 ± 0.89	1.18 ± 0.34	0.87 ± 0.38
F16	3.11 ± 0.96	3.41 ± 1.06	1.27 ± 0.41	1.32 ± 0.61

Negative control: Cell culture medium; Positive control: Triton X100 0.1%

Table 3: The flux and apparent permeability (P_{app}) of salbutamol across stratified TR146 cell layers (n = 3)

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$)	P_{app} ($\times 10^{-3} \text{ cm/h}$)
SS solution 0.2%	10.00 ± 0.58	5.00 ± 0.29
F8 P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.05%	4.42 ± 0.27	2.21 ± 0.14
F9 P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%	3.85 ± 0.46	1.92 ± 0.23
F15 P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%	3.82 ± 0.43	1.91 ± 0.22
F16 P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.1%	3.67 ± 0.44	1.83 ± 0.22

Figure

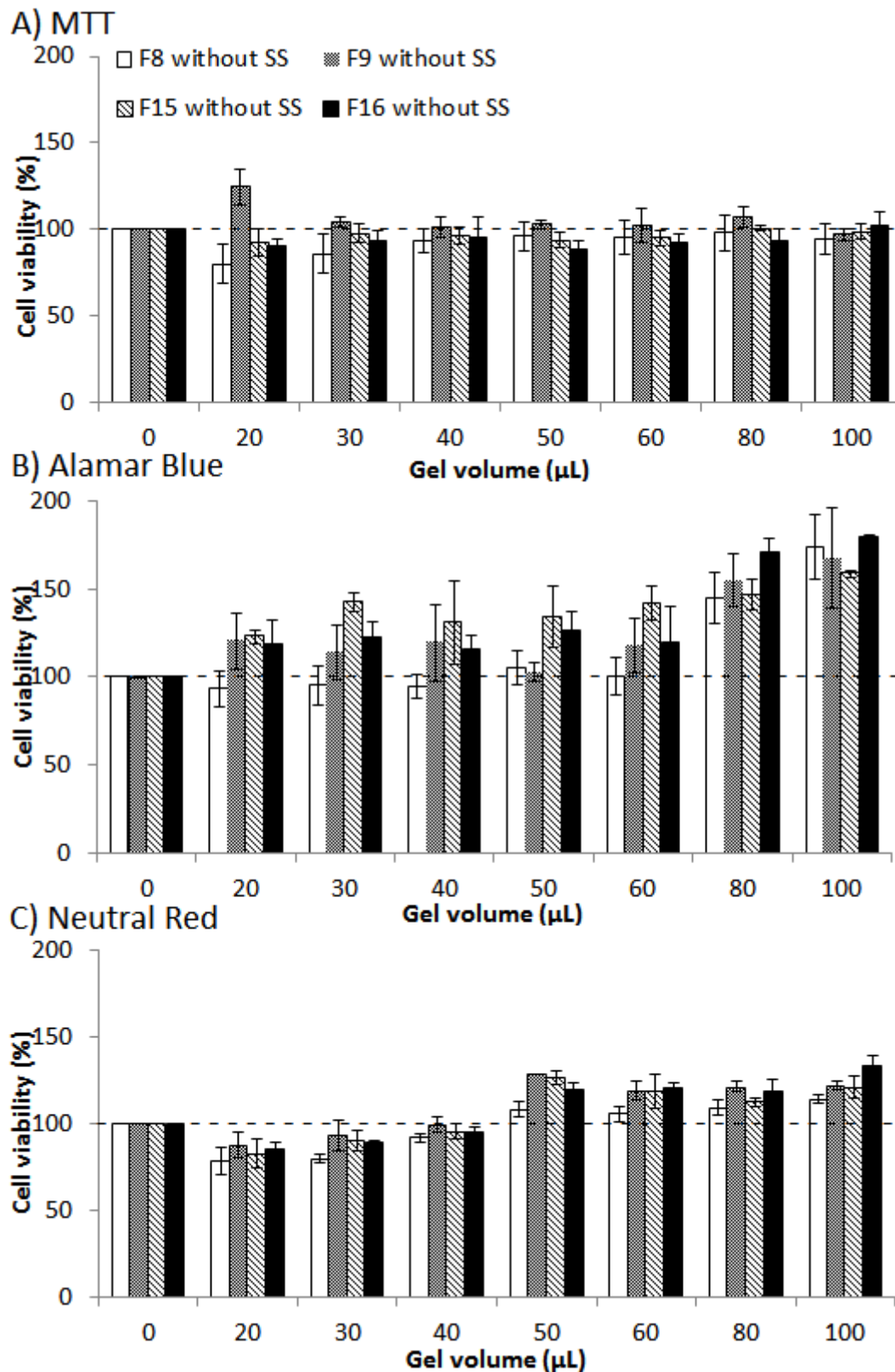


Figure 1. Cell viability after exposure of “vehicle” formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiaxane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0.05%) for 2 hours, measured by different assays: (A) MTT assay (n=3-6). (B) Alamar Blue assay (n=6-9). (C) Neutral red (n=3-6).

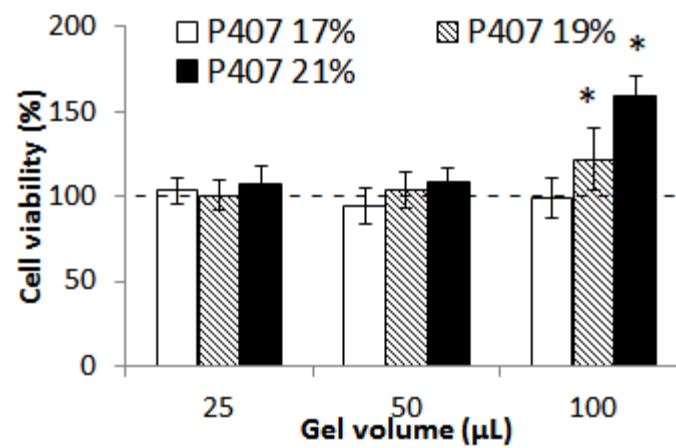


Figure 2. Alamar Blue cell viability assessment (n=6-9) after exposure of P407 alone hydrogels: concentration effect. * $p < 0.05$ versus negative control.

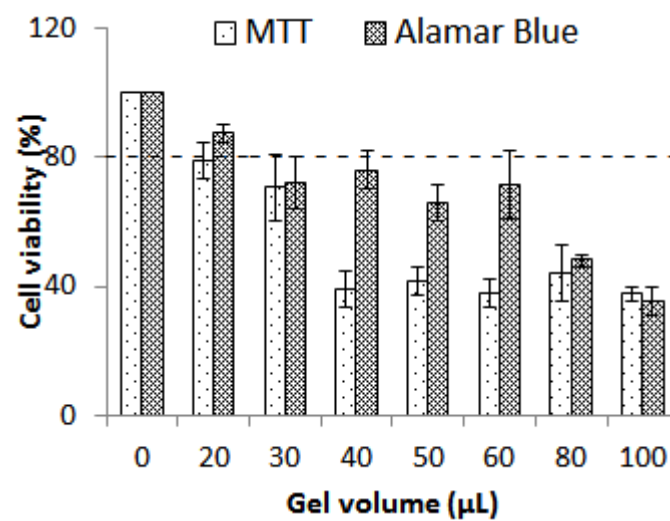


Figure 3. Cell viability after exposure of Salbutamol sulfate solution at pH 3.5, measured by MTT assay (n=3-6) and Alamar Blue assay (n=6-9).

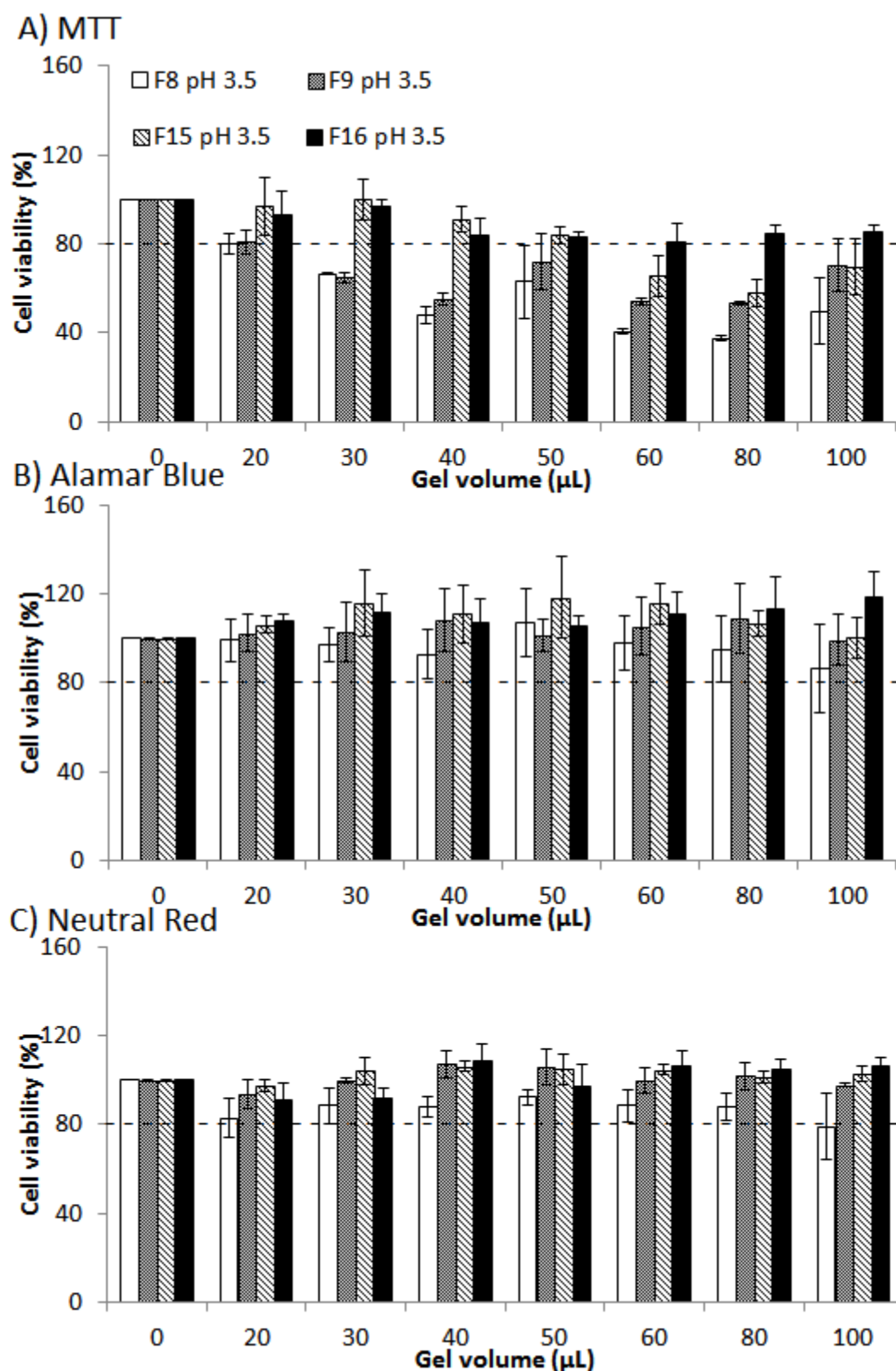


Figure 4. Cell viability after exposure of acidified hydrogel formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%) for 2 hours, measured by different assays: (A) MTT assay (n=3-6). (B) Alamar Blue assay (n=6-9). (C) Neutral red (n=3-6).

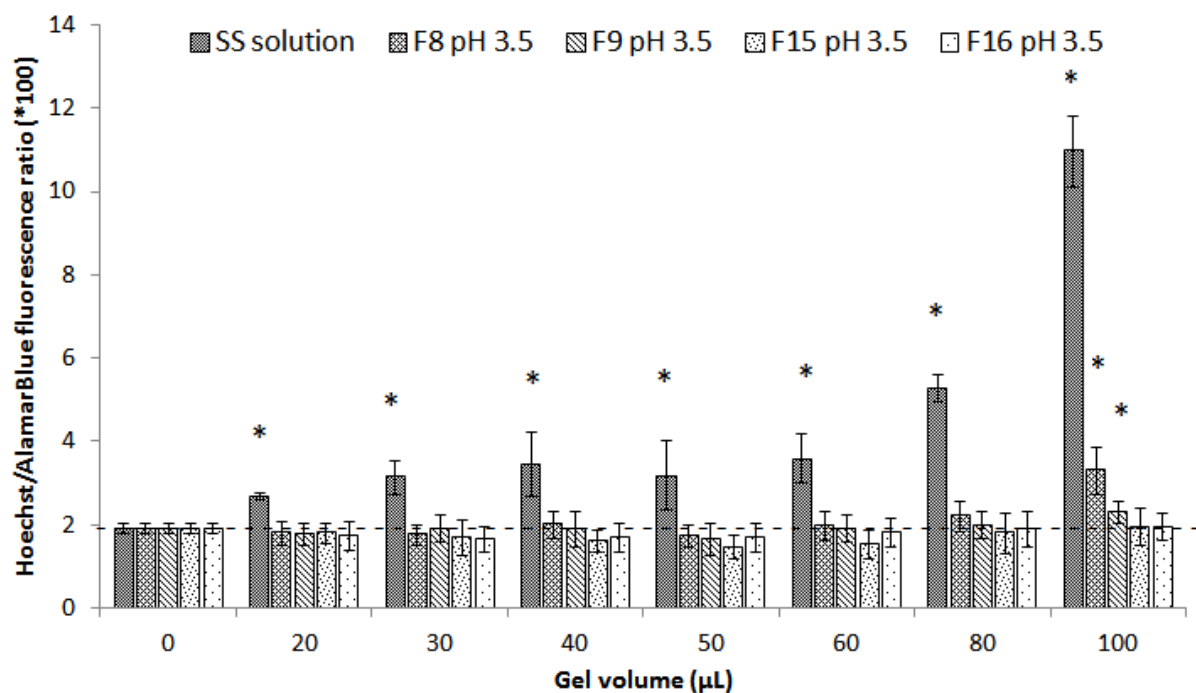


Figure 5. Hoechst 33342/Propidium iodide apoptosis evaluation after exposure of SS solution and acidified hydrogel formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%) for 2 hours (n=6-9).

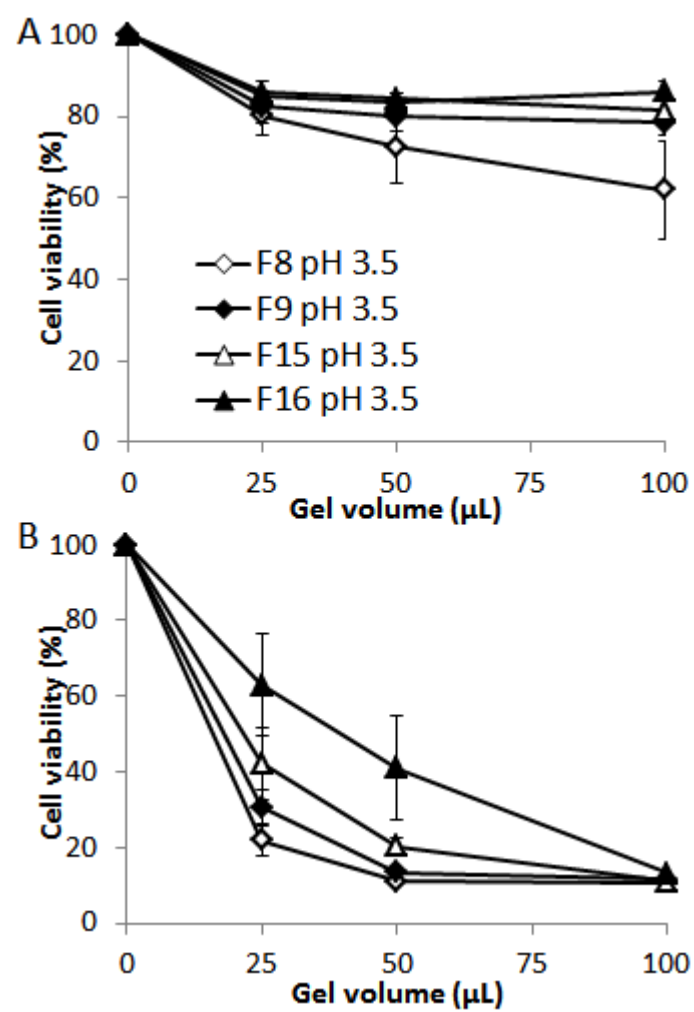


Figure 6. Cell viability measured by MTT assay: (A) Single treatment of 2 h (n=3-6). (B) 4 repeated treatments of 2 h (n=3-6)

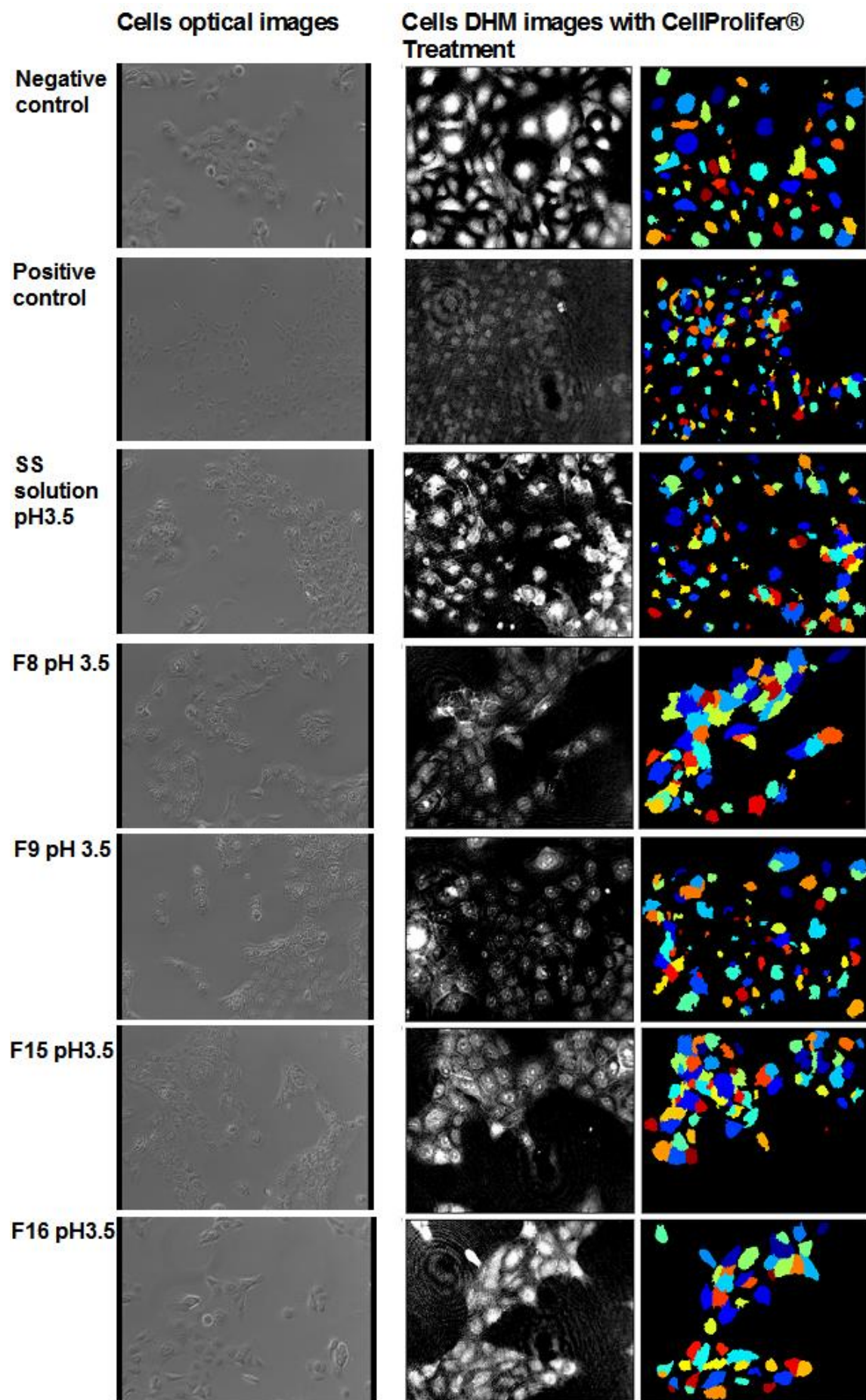


Figure 7. Optical and DHM images of TR146 cell after different treatments. Negative control: cell culture medium; Positive control: Triton X100 0.1%; F8: P407 18%/P188 1% /Satiaxane 0.05%; F9: P407 18%/P188 1% /Satiaxane 0.1%; F15: P407 19%/P188 1% /Satiaxane 0.05%; F16: P407 19%/P188 1% /Satiaxane 0.1%.

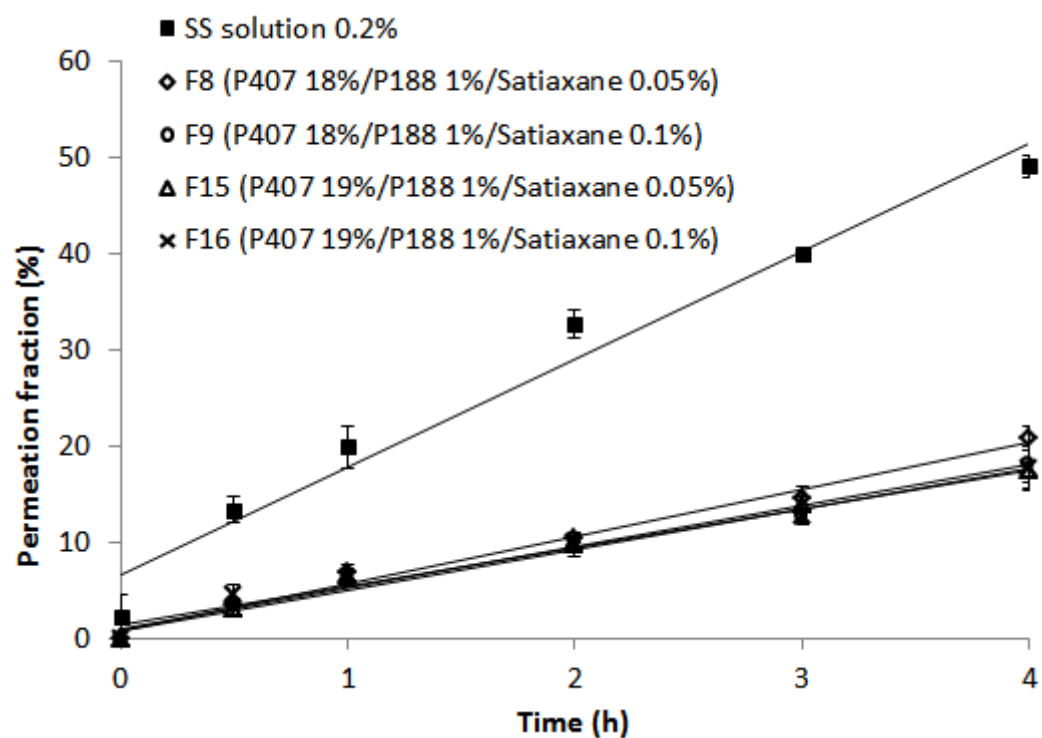


Figure 8. Permeation of SS across Transwell® grown TR146 cell layers: Effect of hydrogel formulations (n = 3).

Supplementary data

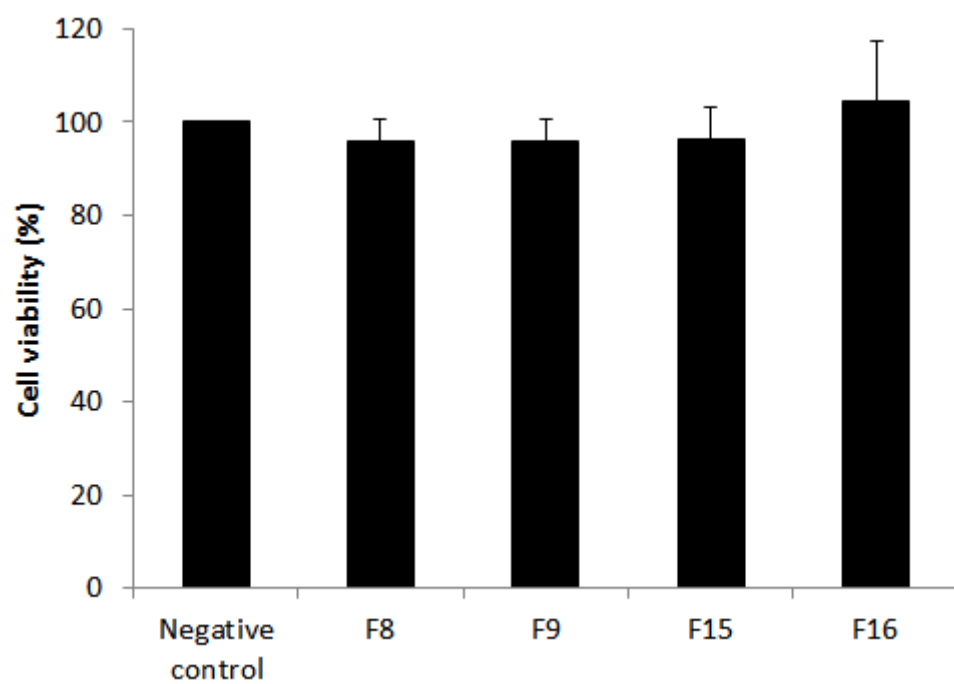


Figure S1. Cell viability after the permeation study, evaluated by MTT assay (n=3)

Travaux complémentaires

Travaux complémentaires : *In vitro* and *in vivo* evaluation of mucoadhesive Poloxamer hydrogel containing a cyanine fluorescent marker

DISCUSSION

GÉNÉRALE

Le rationnel de ce sujet et nos hypothèses de travail reposent sur les données de la littérature présentées dans la première partie : il existe à ce jour une demande, et donc un marché potentiel, pour une forme de salbutamol adaptée au traitement de l'asthme qui répond à des exigences de simplicité d'utilisation et de reproductibilité de la biodisponibilité. Au cours de ces travaux de thèse, des séries d'hydrogels ont été préparées et caractérisées pour administrer le salbutamol par voie buccale. Les avantages de cette voie sont largement admis par les professionnels de santé comme l'atteste le succès des spécialités à base de fentanyl. Le développement de la formulation d'hydrogel a été réalisé en tenant compte des limites et contraintes liées à cette voie. Ce développement a été orienté vers des hydrogels thermogélifiants et mucoadhésifs.

Plus précisément, l'analyse des travaux antérieurs nous a conduit à mettre en avant cinq objectifs (ou critères) principaux de formulation (Figure 45) et à proposer un schéma de développement et d'évaluation possiblement transposable à différentes formulations d'actifs pharmaceutiques dédiées à une administration buccale.

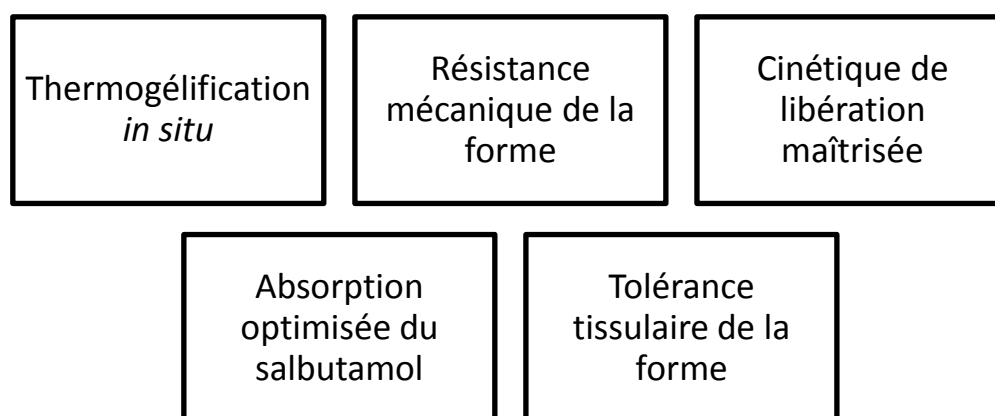


Figure 45 : Principaux critères de la formulation

1. Originalité et intérêt de la composition de formulation

Afin de mettre à profit une probable synergie des propriétés thermogélifiantes et mucoadhésive, des formulations ont été développées en associant deux poloxamères 407 et 188, et de la gomme xanthane (Satiaxane®) +/- NaCl (Figure 46). Comme cela a été mentionné dans la partie bibliographique, l'association du poloxamère avec la gomme xanthane s'est révélée très intéressante pour certaines formes locales muqueuses comme la voie ophtalmique (Shastri et *al.*, 2010). Ce dernier point semble conforter la compatibilité entre ces deux types de polymères, comme nous avons pu le constater lors des différentes phases de ce travail. En revanche, aucun travail à ce jour n'a été réalisé dans le but de

développer une forme buccale mucoadhésive associant ces deux composants, ce qui illustre l'originalité de notre sujet.

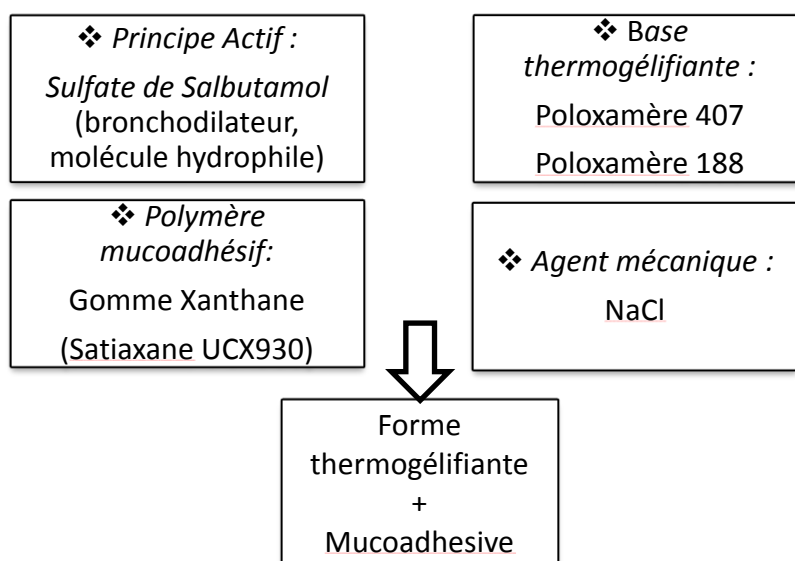


Figure 46 : Principaux composants de la formulation thermogélifiante mucoadhésive

Le choix des composants repose sur leurs fonctions, leurs propriétés physicochimiques mais également sur leur innocuité relative. En conséquence, il a été privilégié des excipients inscrits dans les Pharmacopées et déjà inclus dans des spécialités commercialisées. Les poloxamères 407 et 108 inscrits à la Pharmacopée Européenne sont fréquemment retrouvés dans la composition de formes galéniques diverses. D'après la base Theriaque, les poloxamères 407 et 188 sont répertoriés respectivement dans 36 et 123 spécialités dont Nicorette® spray buccal et Oraquix® gel gingival anesthésiant comportant comme principes actifs la lidocaïne et la prilocaïne ("Thériaque-<http://www.theriaque.org/>," 2015). Cette dernière spécialité associe les deux types de poloxamère et rend compte de leur intérêt et de leur bonne tolérance vis-à-vis de la muqueuse buccale. Par ailleurs, la gomme xanthane apparaît dans 193 spécialités principalement des comprimés et des formes liquides orales (e.g. suspension) ou locales. Si actuellement aucune spécialité en France ne met à profit la gomme xanthane pour une administration sur les muqueuses, ces propriétés mucoadhésives sont largement reconnues dans la littérature (Ikeuchi-Takahashi et *al.*, 2013; Shastri et *al.*, 2010; Vermani et *al.*, 2002). Dans le cadre de notre projet, une des propriétés recherchées a été d'être stable dans une gamme large de pH : ce point est essentiel car une acidification de la préparation est nécessaire en raison de l'instabilité du salbutamol. Dans les travaux

préliminaires, d'autres polymères mucoadhésifs ont été essayés tels que l'HPMC ou l'alginate. Ils n'ont pas été sélectionnés à cause d'une précipitation en milieu acide.

2. Caractéristiques et intérêt du process de fabrication

Les (co)polymères ont été sélectionnés du fait de la simplicité des process qu'ils requièrent lors de la fabrication (Figure 47). L'objectif est de limiter leur nombre à deux ou trois afin de ne pas complexifier la composition et de ne pas favoriser l'apparition d'éventuelle incompatibilité en multipliant les composants. Le mode de préparation ne présente pas de problème particulier de transposition industrielle car les facteurs physicochimiques à maîtriser lors du process de fabrication sont classiques (e.g. agitation, température).

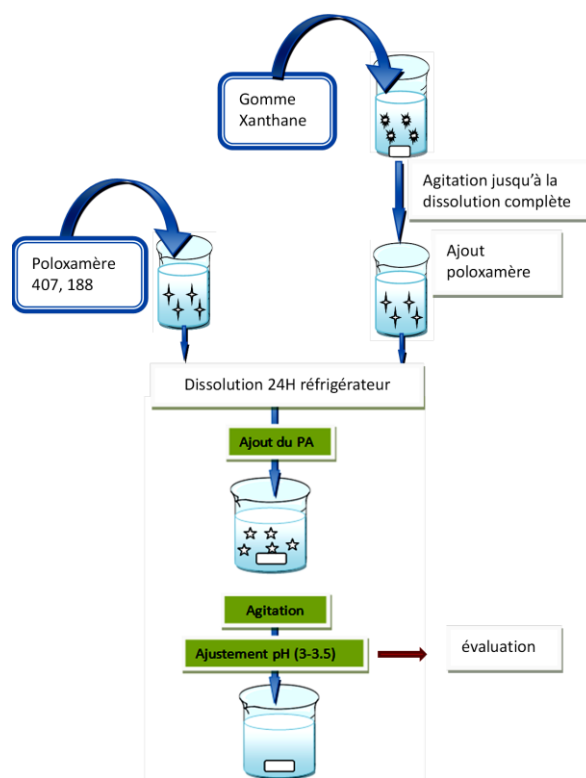


Figure 47 : Protocole de préparation des formulations à base de poloxamère

3. Contribution à l'étude des propriétés thermogélifiantes des hydrogels à usage buccal

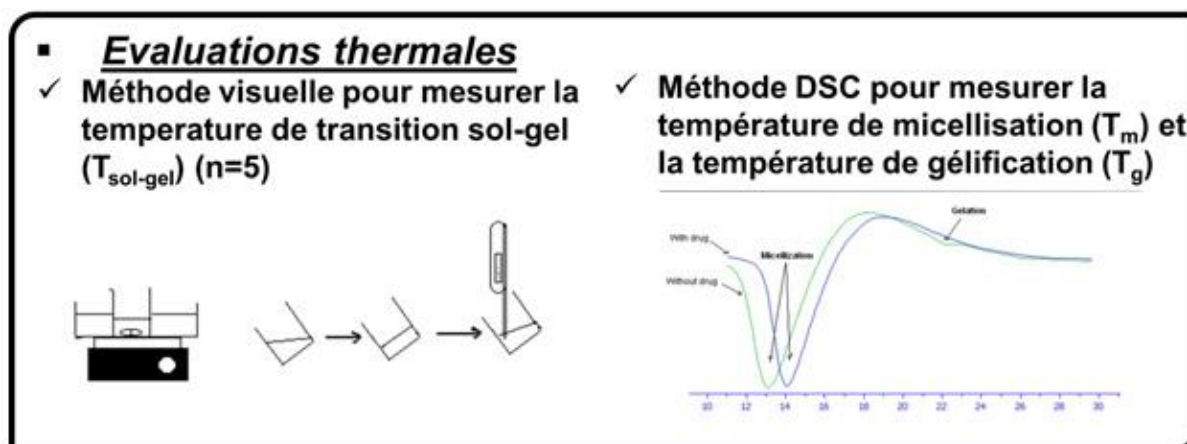


Figure 48 : Rappel des méthodes utilisées dans l'évaluation des propriétés thermogélifiantes

La détermination de la température de transition est une caractéristique fondamentale des hydrogels thermogélifiants (cible 28°C-34°C pour un usage buccal). Plusieurs méthodes ont été proposées (Figure 48) : la méthode visuelle, l'étude rhéologique en écoulement ou en oscillatoire et la DSC. Ces méthodes diffèrent par leur sensibilité mais ont conduit à des résultats similaires. Les méthodes rhéologiques fournissent des informations complémentaires intéressantes au-delà de la simple caractérisation de ce paramètre comme les composantes visqueuses et élastiques des hydrogels. Dans l'article 1, une évaluation du temps de gélification a été proposée dans la mesure où la transition doit s'opérer de la manière la plus instantanée possible et sur un intervalle de température étroit. Outre la détermination de la T_g , DSC présente l'intérêt de mettre en évidence la température et l'enthalpie de micellisation dont les variations peuvent signifier l'existence d'une altération de l'interaction de type hydrophobe.

Les principaux résultats d'intérêt étaient les suivants :

- Plus la concentration en P407 est élevée, plus les températures de gélification sont faibles. Une concentration élevée en poloxamère 407 (i.e. 18 ou 19%) est nécessaire pour assurer la gélification.
- Le P188, qui possède un ratio PEO/PPO plus élevé et une masse molaire moins importante que le P407, augmente la température de micellisation et les températures de gélification. Son association conduit à optimiser la $T_{\text{sol-gel}}$, qui est une stratégie déjà décrite dans la littérature (Qi et *al.*, 2007; Xuan et *al.*, 2011).

Cependant, la température de micellisation T_m est moins influencée que celles de $T_{\text{sol-gel}}$ et T_g . Cela semble indiquer que les molécules de P188 peuvent modifier l'interaction intermicellaire entre les chaînes de PEO.

- Le NaCl, en revanche, diminue les températures de gélification et de micellisation. Ces phénomènes sont probablement liés à son effet ionique « salting out », qui rend l'eau plus polaire, venant favoriser la déshydratation des motifs de PPO et l'interaction entre les unités de PEO (Choi et *al.*, 1999).

Si ces observations viennent confirmer les données de la littérature, notre travail apporte des éléments nouveaux vis-à-vis de l'association avec la gomme xanthane et de l'influence du salbutamol. En effet, la Satiaxane® augmente légèrement les températures de micellisation et de gélification. Sa structure macromoléculaire semble perturber la micellisation comme l'indique la modification de la T_m . Néanmoins, ces phénomènes sont mineurs et nos résultats permettent de conclure que la gomme xanthane n'altère pas les propriétés thermogélifiantes des hydrogels de poloxamère

Nos résultats confirment que la détermination de la température de transition est une excellente méthode de screening rapide. Elle reste indispensable du fait des nombreuses interactions que développe le P407 avec divers composés. Les formulations associant P407 (18 et 19%) avec P188 (1%) et Satiaxane® (0,05-0,1%) +/-NaCl ont été retenues pour des évaluations ultérieures.

4. Contribution à l'étude des propriétés mécaniques des hydrogels à usage buccal

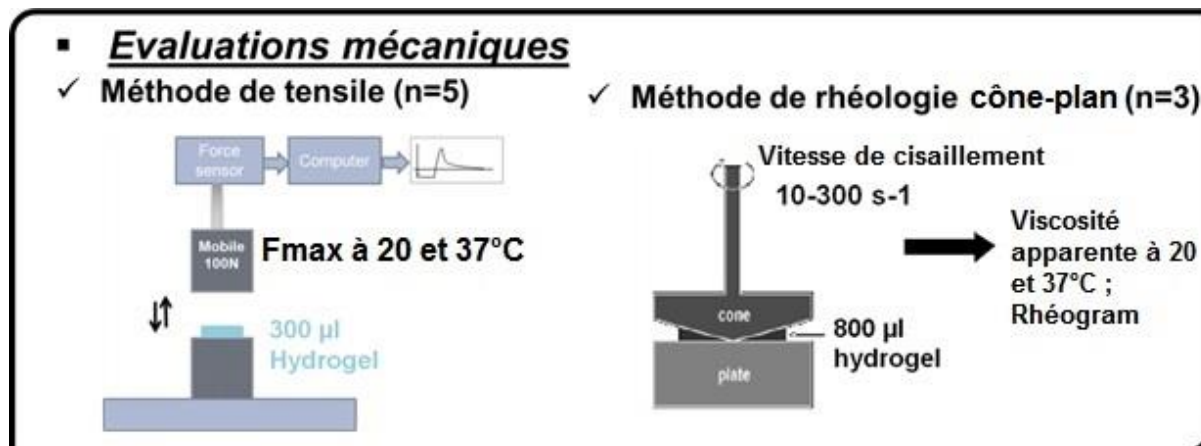


Figure 49 : Rappel des méthodes utilisées dans l'évaluation mécanique

Les propriétés mécaniques des hydrogels sont importantes à étudier car ils définissent la texture de la forme, ce qui détermine le choix du dispositif d'administration ainsi que la persistance de la forme sur le site d'administration.

Dans notre étude, une méthode d'arrachement à l'aide d'un dynamomètre ainsi qu'une analyse rhéologique ont été retenues (Figure 49). Quelle que soit la méthode appliquée, les essais ont été réalisés à deux températures : 20°C (reflétant les conditions de conservation ou d'administration de la dose), et 37°C (reproduisant les conditions physiologiques une fois la préparation déposée *in vivo*).

Comme cela a été mentionné dans le paragraphe précédent, nous avons procédé à une analyse rhéologique par écoulement et en oscillatoire. L'analyse rhéologique est en effet généralement citée dans les travaux traitant des poloxamères (Chang et *al.*, 2002; Edsman et *al.*, 1998) car elle fournit des renseignements à la fois pratiques pour la formulation (e.g. $T_{sol-gel}$) et fondamentaux pour une meilleure compréhension des phénomènes moléculaires. Nos résultats sont conformes à la littérature et soulignent que si les ratios de viscosité apparente entre 37°C et 20°C sont très importants (de l'ordre de 100 à 300), ceux-ci diminuent en présence de P188, NaCl ou Satiaxane®. Dans le cadre de notre application, l'ajout de l'agent mucoadhésif fournit une viscosité non négligeable à température ambiante mais le comportement reste de type newtonien avant la transition. Des essais complémentaires en rhéologie oscillatoire pourraient apporter des informations utiles sur le caractère visqueux à 37°C et sur la recherche des seuils d'écoulement.

Les essais d'arrachement servent en absence de mucine à évaluer la dureté et les propriétés intrinsèques de l'hydrogel. Les forces maximales ($F_{\max}$) à 37°C sont plus élevées que celles à 20°C en relation avec la transition de phase (ratio de l'ordre de 1,1 à 1,6). De manière similaire avec les viscosités, ce ratio tendait à diminuer avec la Satiaxane® en relation avec son pouvoir épaississant à faible concentration (0,05-0,1%).

5. Contribution à l'étude des mécanismes de libération à partir des hydrogels à usage buccal

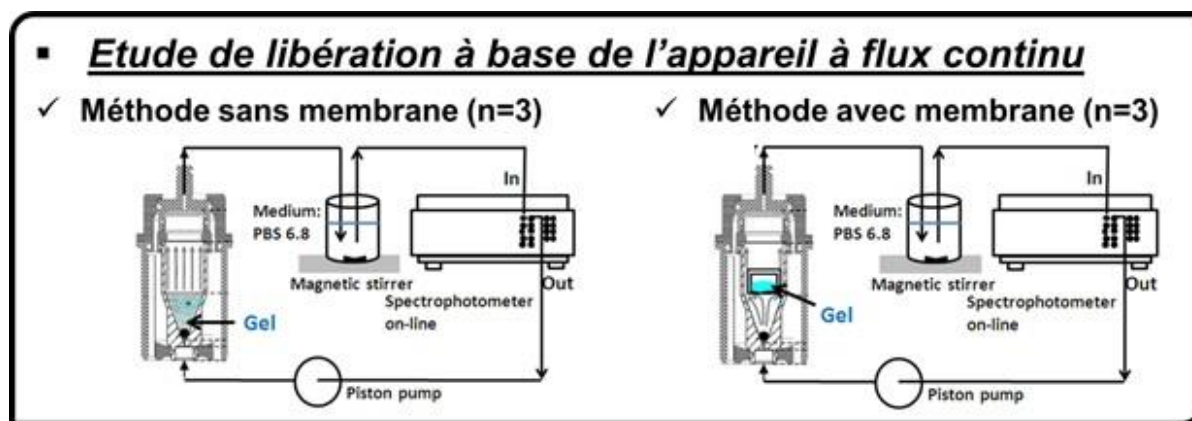


Figure 50 : Rappel des méthodes utilisées dans l'étude de libération.

L'étude de libération est une phase indispensable dans l'évaluation des formulations. Elle permet non seulement de déterminer des paramètres essentiels comme la vitesse de libération, mais aussi de comprendre l'effet de chacun des composants notamment à l'aide des modèles mathématiques.

L'originalité de notre démarche a été d'utiliser des modèles complémentaires prenant en compte les caractéristiques de la sphère buccale (i) et d'individualiser les deux mécanismes concourant à la libération (i.e. diffusion et érosion) (ii). Idéalement, la libération du PA à partir des formes buccales doit se réaliser par diffusion, l'érosion correspondant à un drainage vers le tractus digestif. Dans le cas d'une forme buccale, une fois administrée au niveau de la muqueuse, celle-ci est entourée par deux environnements. Du côté intracavitaire, le gel est soumis au flux salivaire à l'origine d'un effet « wash out ». Du côté intratissulaire, le PA va diffuser à partir du gel et pénétrer dans la muqueuse buccale puis entrer dans la circulation sanguine. Afin de simuler ces deux comportements, deux méthodes avec et sans membrane ont été utilisées (Figure 50). A partir de l'appareil de dissolution USP IV, dans la cellule standard, le gel étant essentiellement éliminé ou dissous du fait de l'intensité du flux du

milieu : l'érosion est souvent le mécanisme principal de libération. Grâce à l'équation de Peppas-Sahlin 2, la part respective de l'érosion et de la diffusion apparaît clairement à chacun des temps. Il est à noter qu'au début de la libération, la diffusion du PA prédomine et certaines formules « résistent » mieux à l'érosion en particulier celles contenant de la gomme xanthane. En revanche, dans l'adaptateur pour les semi-solides, le gel et le milieu de dissolution sont séparés par une membrane semi-perméable. Seule la diffusion est alors étudiée à l'aide de l'équation Higuchi comme dans la cellule de Franz. Les cinétiques de libération ont été ralenties par rapport au modèle sans membrane en raison d'une surface d'échange plus petite et d'une moindre exposition au flux de la phase mobile.

Sur le plan technique, ces appareils automatiques permettent de mesurer six échantillons en même temps : un gain de temps a été observé par rapport à une méthode de dissolution classique et à la cellule de Franz. A notre connaissance, notre étude est la première publication qui démontre l'intérêt de l'appareil USP IV pour évaluer les formes semi-solides notamment avec l'adaptateur.

L'utilisation de ces deux configurations (avec et sans membrane) et des modèles mathématiques nous a permis d'observer les phénomènes intéressants suivants :

- Pour le P407, lorsque la concentration utilisée augmente (18% à 19%), la libération est ralentie uniquement avec le modèle avec membrane, du fait d'un réseau plus compact. Au contraire, en raison de l'importance du flux dans le modèle sans membrane, la forme est rapidement dispersée dans le milieu.
- La présence du P188 accélère la libération du PA, l'effet est plus marqué dans la méthode avec membrane. Un effet « burst » est observé, qui est probablement dû à un relâchement du réseau réticulé par le P188. Le traitement mathématique montre, néanmoins, que la contribution du phénomène de diffusion devient plus importante dans le cas des formulations contenant le P188. Ceci conforte l'intérêt d'associer les deux poloxamères malgré une libération plus rapide.
- L'ajout du NaCl accélère la libération uniquement dans la méthode sans membrane. Le phénomène érosif est ici majoritaire. En pratique, cela signifie que la forme peut être facilement dissoute par la salive qui entraînera une perte de médicament vers le tractus digestif.
- La Satiaxane® ralentit significativement la libération avec les deux méthodes. Le phénomène de diffusion est le mécanisme prédominant tout au long de la

libération. Cela confirme la formation d'une matrice résistante et moins perméable en présence de la Satiaxane®.

En conséquence, la démarche originale proposée en termes d'appareillage, de modèles et de traitement mathématique semble très adaptée aux formes hydrogels. Elle vient renforcer les autres techniques de screening. Elle confirme l'intérêt du P188 et de la gomme xanthane pour réduire les phénomènes d'érosion observés avec le P407. En revanche, ces résultats ont conduits à écarter le NaCl de notre formulation. En effet, son pouvoir "durcisseur" attendu, n'a pas été confirmé. Néanmoins, les conditions opératoires sont très éloignées de celles du milieu physiologique en termes de flux et de volume de la phase dispersante. La méthode pourrait ainsi prendre en compte ces éléments mais nécessiterait une validation préalable. Il est apparu plus pertinent de s'intéresser alors à des essais de perméation ou *in vivo* chez l'animal.

6. Contribution à l'étude des propriétés mucoadhésives des hydrogels à usage buccal

Dans les essais de mucoadhésion, la mucine gastrique du porc a été employée en raison des difficultés liées à l'utilisation de la muqueuse animale. Un dynamomètre a été utilisé pour déterminer la dureté mais en présence cette fois-ci d'un film de mucine. Dans nos travaux complémentaires, le pouvoir mucoadhésif des formulations contenant de la gomme xanthane a été mis en évidence à 20°C. En revanche, à 37°C, le test a montré ses limites dans la mesure où les différences étaient minimisées en présence ou non de mucine. A cette température, le pouvoir discriminant de cette méthode est altéré en raison de la très grande viscosité des échantillons. Ce modèle quoique simple à mettre en œuvre devrait être complété par d'autres techniques pour une investigation plus complète (e.g. prélèvement de membrane physiologique, mesure de l'angle de contact...) (Davidovich-Pinhas et Bianco-Peled, 2010). L'influence de l'ajout de mucine sur le comportement rhéologique pourrait également fournir des éléments intéressants sur le pouvoir mucoadhésif de la gomme xanthane (Hassan et Gallo, 1990).

Du fait des limites des méthodes *in vitro*, la mise en place d'essais *in vivo* est nécessaire pour déterminer les temps de présence au niveau buccal. Cette étape doit permettre de valider la mucoadhésion de la formule. Dans la partie travaux complémentaires, il a été proposé une démarche innovante, non invasive, en intégrant un marqueur fluorescent. En effet, les méthodes rapportées dans la littérature sont la γ scintigraphie, l'autoradiographie ou

l'observation visuelle. Le marqueur fluorescent proposé est la Cyanine 5 diméthyl, synthétisé au laboratoire UTCBS. Dans la mesure où ce marqueur doit rendre compte de la persistance des hydrogels sur le site d'application, celui-ci ne doit ni être absorbé de manière significative par la muqueuse ni libéré par la formulation. Le marqueur doit rester inclus dans l'hydrogel et n'être éliminé que par le drainage de la forme, c'est-à-dire par érosion. Les premiers résultats ont été encourageants. En effet, la perméation du marqueur à travers les cellules TR146 est très faible avec un flux réduit de l'ordre de 10 à 15 par rapport à celui du salbutamol, selon les formulations. Par ailleurs, le mécanisme de libération est ici principalement régi par l'érosion avec une valeur de l'exposant n de l'équation de Korsmeyer-Peppas variant de 0,78 à 0,87. Des essais décrits dans les travaux complémentaires sont en cours de finalisation chez la souris pour étudier le temps de présence de la forme après application buccale.

7. Contribution à l'étude de perméation des principes actifs à partir des hydrogels à usage buccal

L'étude de perméation sur la lignée TR146 procure des informations sur le passage du salbutamol à travers les cellules. Certes, le passage transbuccal a déjà été rapporté par de nombreux auteurs (De Caro et *al.*, 2008; Nielsen et Rassing, 2000; Sander et *al.*, 2013) mais nos résultats confirment qu'en solution le salbutamol diffuse de manière rapide avec un flux de $10,0 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$ et un P_{app} de $5,0 \times 10^3 \text{ cm/h}$. L'originalité de la démarche a été de déterminer l'impact de l'incorporation du salbutamol dans la formulation. La diffusion à travers les cellules prend en compte dans un premier temps la libération du principe actif à partir de la formulation suivie de son passage cellulaire (modèle bicomportemental). La perméation à partir de nos hydrogels thermosensibles a conduit à des cinétiques linéaires similaires mais à des flux environ trois fois plus faibles qu'avec la solution simple. Par ailleurs, nous avons vu que le système Transwell® à base de cellule TR146 a permis de démontrer la faible perméation du marqueur fluorescent à partir des formulations.

8. Contribution à l'étude de la cytotoxicité des hydrogels à usage buccal

Grâce à ses propriétés mécaniques et mucoadhésives, notre forme est supposée rester en contact à la muqueuse buccale pendant quelques heures. De ce fait, l'innocuité de la forme vis-à-vis de la muqueuse buccale représente un challenge majeur lors du développement. Comme cela a été indiqué, le choix des excipients a été mené en tenant compte de ce critère. L'étude de la tolérance est principalement menée à l'aide de tests de cytotoxicité *in vitro* sur

culture cellulaire ou sur des prélèvements de tissus puis d'essais *in vivo* chez l'animal en administration unique ou répétée.

Dans notre article 2, le choix de la lignée cellulaire TR146 repose sur des caractéristiques qui sont similaires à celles de l'épithélium buccal humain (Jacobsen et *al.*, 1995). Des tests classiques ont été réalisés sur des formulations associant P407, P188 et Satiaxane® : activité mitochondriale par MTT, métabolique par le test Alamar Blue, intégrité cellulaire par le Rouge Neutre et apoptose par l'utilisation de l'agent Hoechst 33342. Par ailleurs, une nouvelle méthode, l'analyse des changements de morphologie par Microscopie Holographique Digitale, a été employée pour compléter cette étude.

En synthèse, ces tests de cytotoxicité effectués ont apporté les éléments suivants :

- Innocuité des véhicules sans principe actif P407/P188/Satiaxane® vis-à-vis des tests MTT et Rouge Neutre
- Cytoprotection observée avec le test Alamar Blue proportionnelle au volume déposé. Un essai complémentaire suggère que cette action est liée à la présence du poloxamère 407 (à partir de la concentration seuil de 19%)
- Action cytotoxique du sulfate de salbutamol en raison du pH acide de cette solution (tests MTT et Alamar Blue) en partie compensée par les excipients, en particulier avec la formulation P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0,1%. Cette action préventive est surtout observée en application unique car après quatre applications répétées de 2h, une cytotoxicité complète est retrouvée.
- Meilleure innocuité montrée dans les résultats de la formulation associant P407 19%/P188 1%/Satiaxane 0,1% en application simple ou répétée. Ce résultat semble lié à une plus forte concentration en poloxamère et en gomme xanthane et à la probable capacité à freiner la libération du principe actif acidifié.

Nos résultats montrent que les essais de cytotoxicité doivent englober différents tests qui traduisent différentes cibles métaboliques (MTT et Alamar Blue) ou membranaires (Rouge Neutre) pouvant induire la mort cellulaire. Certains résultats sont dépendants du volume et donc des quantités apportées dans le puits de culture. Le mécanisme de la cytotoxicité par apoptose ou nécrose doit être également renseigné.

Ainsi, il a été constaté qu'une méthode d'évaluation peut être plus sensible qu'une autre ou aboutir à un résultat complètement différent (Weyermann et *al.*, 2005). Par exemple, les tests MTT et Alamar Blue indiquent tous les deux l'activité métabolique, néanmoins les lieux de réaction et les enzymes impliqués ne sont pas les mêmes. Afin d'éviter les faux

résultats causés par l'activation ou l'inhibition des enzymes par certains composants, le test Rouge Neutre mesurant l'état de membrane de cellules a été ajouté à notre série de tests.

Des travaux antérieurs viennent conforter l'action cytoprotectrice de certains poloxamères (Exner et *al.*, 2005). Cependant, cet effet dépend du type de poloxamère et de la valeur de Balance Hydrophile/Lipophile (HLB). Généralement, les poloxamères qui ont un long bloc PPO hydrophobe, montre un effet de sensibilisation sur les cellules (Batrakova et *al.*, 1999). Ils peuvent interagir avec la membrane cellulaire en la déstabilisant, ce qui expliquerait leur application dans le traitement anticancéreux (Batrakova et Kabanov, 2008; Guo et *al.*, 2007; Yan et *al.*, 2010). La concentration en poloxamère semble être un autre facteur important car des études suggèrent que le poloxamère ne montre ces effets que sous forme unimère. En outre, plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence un effet protecteur du poloxamère 188 vis-à-vis de la nécrose ainsi que de l'apoptose (Luo et *al.*, 2013; Serbest et *al.*, 2006).

Enfin, la Microscopie Holographique Digitale (DHM) est utilisée pour la première fois sur les cellules TR146. Cette méthode non invasive sans aucun traitement préalable sur les cellules détecte tout changement de morphologie (Alm et *al.*, 2013). Cette méthode s'est révélée sensible et ces résultats concordant aux tests classiques employés dans notre étude. A titre d'illustration, les observations en DHM confirment l'avantage de la formulation P40719%/P188 1%/Satiaxane® 0,1% en termes d'innocuité sur les cellules.

CONCLUSION

GENERALE

La thématique portant sur l'évaluation des hydrogels à base de poloxamère a fait l'objet de très nombreuses études. Ces travaux se focalisent généralement sur un des aspects de leur évaluation, comme les propriétés thermogélifiantes ou rhéologiques ainsi que les mécanismes de libération. En outre, peu de travaux décrivent les formulations associant poloxamères et polymères mucoadhésifs dans l'application buccale. Notre travail peut être considéré comme une contribution à cette thématique.

Au terme de ces trois années de recherche pluridisciplinaire, un bilan d'étape est nécessaire par rapport aux objectifs initiaux mettant en avant les avancées et limites de notre travail ainsi que les perspectives de ce projet. L'analyse de la littérature dans un premier temps puis l'expérience acquise sur ce type de « véhicule » dans un deuxième temps, nous permettent de proposer un schéma de développement (Tableau 19). Ces différentes étapes sont applicables à d'autres principes actifs que le salbutamol ou à l'incorporation de formes galéniques innovantes comme les nanoparticules. Les critères de choix des méthodes mises en œuvre ont été présentés dans la partie travaux antérieurs. Néanmoins, pour chacune de ces étapes, il existe des alternatives possibles : par exemple les méthodes rhéologiques en présence de mucine pourraient probablement remplacer le dynamomètre.

La première étape vise à prédéfinir les principaux composants qui doivent être stables, (bio)compatibles, biologiquement inertes, peu coûteux et faciles à mettre en œuvre lors du process de fabrication. Les étapes 2, 3 et 4 s'intéressent aux propriétés de base de la préparation : thermogélification (température cible 28-34°C), mucoadhésion (ratio élevé de la force d'arrachement en présence de mucine) et libération légèrement prolongée principalement régie par la diffusion. Ces essais conduisent à sélectionner des formulations (screening). Les étapes 5 et 6 sont à mettre en œuvre avant tout essai chez l'animal. A l'aide de la lignée cellulaire TR146, il est possible d'une part de déterminer la perméation du principe actif et l'influence de la formulation (système Transwell®) et d'autre part de rechercher une éventuelle cytotoxicité. Enfin, les dernières étapes 7, 8, 9 sont menées *in vivo*. La démonstration de la persistance de la forme au niveau buccal est un prérequis indispensable. Un marqueur fluorescent peu diffusible dans la matrice gélifiée et faiblement perméable vis-à-vis de la muqueuse buccale permet de suivre « en temps réel » le devenir de la préparation. La pharmacocinétique doit mettre en évidence une meilleure biodisponibilité de la formulation et une prolongation des cinétiques plasmatiques. Enfin, d'autres essais chez l'animal comme l'étude de la tolérance locale en dose unique ou répétée sont à envisager.

Tableau 19 : Principales étapes de formulation et caractérisation de forme thermogélifiante mucoadhésive destinée à la voie buccale - Etat d'avancement du projet (Etapes menées à terme : fond blanc ; En cours : fond gris clair ; A envisager : fond gris foncé)

1-Formulation • Choix de l'agent thermogélifiant et de sa concentration • Choix de l'agent mucoadhésif et de sa concentration • Agent visant à stabiliser le principe actif • Autres composants
2-Essais <i>in vitro</i> de thermogélification • Température de gélification déterminée visuellement • Températures de micellisation et de gélification par DSC • Température de gélification par l'étude rhéologique
3-Essais <i>in vitro</i> des comportements mécaniques et de mucoadhésion • Force d'arrachement par un dynamomètre avec et sans mucine • Viscosités et comportements rhéologiques à 20 et 37°C
4-Essais de libération effectués par l'appareil USP IV • Méthodes avec ou sans membrane • Modélisation
5-Essais de cytotoxicité sur la lignée cellulaire TR146 • Viabilité de cellules évaluée par les tests de MTT, Alamar Blue • Intégrité de cellules évaluée par le Rouge Neutre • Apoptose de cellules évaluée par le réactif Hoechst 33342 • Microscopie holographique digitale
6- Essais de perméation sur la lignée cellulaire TR146 • Essai de perméation du principe actif seul • Influence de la formulation sur la perméation
7- Essais <i>in vivo</i> en imagerie chez la souris (ou autre animal) • Présence de la forme sur le site d'application suivi par la Cyanine • Fluorescence détectée par la caméra Fluobeam® comparant une solution simple <i>versus</i> la formulation d'intérêt
8-Essais de pharmacocinétique chez le lapin • Comparaison des cinétiques plasmatiques d'une solution simple <i>versus</i> la formulation d'intérêt
9- Autres essais <i>in vivo</i> chez l'animal • Essais de tolérance en application unique et répétée

Ce schéma expérimental a l'avantage de préciser l'état d'avancement de notre projet. A ce jour, les étapes 1 à 6 ont été menées à leur terme. En revanche, les étapes 7 et 8 sont en cours, des premiers essais chez l'animal ont été réalisés et restent dans l'attente du dosage effectif des échantillons prélevés. La dernière étape 9 n'a pas été initiée à ce stade car elle doit correspondre à des essais selon BPL (bonnes pratiques de laboratoire) en vue d'une commercialisation aujourd'hui encore hypothétique.

Grâce à ces techniques d'évaluation, nous avons mis en évidence l'intérêt d'hydrogels à base de poloxamère 407, poloxamère 188 et gomme xanthane. Le rôle de chacun des composants est le suivant :

*Poloxamère 407 : Agent thermogélifiant, possible action cytoprotectrice

Néanmoins, ce copolymère favorise l'élimination de la forme par érosion

*Poloxamère 188 : Ajustement de la température de transition

Ce copolymère réduit la proportion de salbutamol libéré par le mécanisme d'érosion

*Gomme xanthane : Agent mucoadhésif

Ce polymère consolide l'hydrogel et réduit également les phénomènes d'érosion

*Acide sulfurique : Ajustement du pH pour stabiliser le salbutamol

L'ajout de cet acide est associé à une cytotoxicité importante mais très significativement réduite par le véhicule.

Les formulations développées ont montré une tendance favorable à une teneur élevée en poloxamère 407 et en gomme xanthane. Le poloxamère 188 a permis d'atteindre les objectifs initiaux et ce en intervenant sur :

- Comportement adapté de thermogélification ($T_{\text{sol-gel}}$ d'environ 32°C pour F16 (P407 19%/P188 1%/Satiaxane® 0,1%))
- Propriétés mécaniques intéressantes (Force d'arrachement F_{max} 26,3 N, viscosité apparente 13,1 Pa.s à 37°C pour F16)
- Capacité de mucoadhésion importante (Augmentation d'environ 50% de la force d'arrachement en présence de mucine à 20°C)
- Libération légèrement prolongée du sulfate de salbutamol (T50% de respectivement 35,4 et 38,2 minutes avec le modèle sans et avec membrane pour F16).
- Action cytoprotectrice en application unique prévenant la nécrose et l'apoptose induites par le principe actif acidifié pour F16
- Perméabilité contrôlée à travers les cellules TR146 (Perméabilité apparente P de $1,83 \times 10^3$ cm/h pour F16 versus $5,00 \times 10^3$ cm/h pour la solution de sulfate de salbutamol).

Ce travail propose ainsi des formulations qui pourraient bénéficier d'un développement ultérieur avec notre partenaire industriel, soit avec le salbutamol (ou d'autres principes actifs) soit avec formes innovantes (e.g. nanoparticules). Des formulations contenant

un marqueur fluorescent ont été mise au point dans le domaine de l'imagerie. Les travaux en cours, chez l'animal, pourraient confirmer leur intérêt dans le traitement de l'asthme. Néanmoins, notre projet souligne la complexité des facteurs à prendre en compte. Il illustre les nombreux points critiques qui sont rencontrés lors du développement des formes buccales à visée systémique. Le drainage de la préparation au niveau buccal constitue un vrai challenge sur le plan pharmacotechnique. La prise en compte de la fragilité de la muqueuse est essentielle car elle conditionne la bonne tolérance, l'acceptabilité par le patient et la reproductibilité de l'effet thérapeutique. Ainsi, ce projet a nécessité de réunir de multiples compétences dans les domaines du médicament, de la toxicologie et de l'imagerie. Celui-ci a bénéficié d'une collaboration étroite entre partenaires industriel, hospitalier et universitaire. Sur le plan de la démarche scientifique, ce travail évalue des techniques innovantes dans le domaine de l'imagerie comme la microscopie holographique digitale pour détecter une altération de la morphologie cellulaire ou comme la validation d'un marqueur fluorescent qui permettrait de suivre le devenir des préparations *in situ*. De manière plus générale, ces nouvelles techniques pourraient contribuer à mieux caractériser les hydrogels qui suscitent un intérêt grandissant dans les domaines scientifiques ou pharmaceutiques.

Références bibliographiques

- Albrecht, K., Greindl, M., Kremser, C., Wolf, C., Debbage, P., Bernkop-Schnürch, A., 2006. Comparative in vivo mucoadhesion studies of thiomers formulations using magnetic resonance imaging and fluorescence detection. *J. Control. Release.* 115, 78–84.
- Alm, K., El-Schich, Z., Falck, M., Gjrloff Wingren, A., Janicke, B., Oredsso, S., 2013. Cells and Holograms – Holograms and Digital Holographic Microscopy as a Tool to Study the Morphology of Living Cells, in: Mihaylova, E. (Ed.), *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications*. InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/>.
- Ameye, D., Mus, D., Foreman, P., Remon, J.P., 2005. Spray-dried Amioca starch/Carbopol 974P mixtures as buccal bioadhesive carriers. *Int. J. Pharm.* 301, 170–180.
- Anatomie et physiologie de la cavité buccale [WWW Document], 2014. www.cancer.ca. URL <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/oral/anatomy-and-physiology/?region=on> (accessed 12.16.14).
- Andrews, G.P., Laverty, T.P., Jones, D.S., 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 505–518.
- Asane, G.S., Nirmal, S.A., Rasal, K.B., Naik, A.A., Mahadik, M.S., Rao, Y.M., 2008. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 1246–1266.
- Attia, M.A., El-Gibaly, I., Shaltout, S.E., Fetih, G.N., 2004. Transbuccal permeation, anti-inflammatory activity and clinical efficacy of piroxicam formulated in different gels. *Int. J. Pharm.* 276, 11–28.
- Baloğlu, E., Karavana, S.Y., Hyusein, I.Y., Köse, T., 2010. Design and formulation of mebeverine HCl semisolid formulations for intraorally administration. *AAPS PharmSciTech.* 11, 181–188.
- Baloğlu, E., Ozyazici, M., Hizarcioğlu, S.Y., Karavana, H.A., 2003. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. *Farmaco.* 58, 391–396.
- Bard, M., Yazji, R., Salmeron, S., 1999. Place respective des beta2-agonistes de courte et de longue durée d'action dans la maladie asthmatique. *Médecine Thérapeutique.* 5, 654–662.
- Barry, B.W., 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release.* 6, 85–97.
- Basly, J.P., Duroux, J.L., 1997. The effect of gamma radiation on the degradation of salbutamol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1137–41.
- Batchelor, H.K., Banning, D., Dettmar, P.W., Hampson, F.C., Jolliffe, I.G., Craig, D.Q.M., 2002. An in vitro mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the oesophagus. *Int. J. Pharm.* 238, 123–132.
- Batrakova, E., Lee, S., Li, S., Venne, A., Alakhov, V., Kabanov, A., 1999. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm. Res.* 16, 1373–1379.
- Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release.* 130, 98–106.
- Beckett, A.H., Moffat, A.C., 1968. The influence of alkyl substitution in acids on their performance in the buccal absorption test. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, Suppl:239S+.
- Beckett, A.H., Moffat, A.C., 1969. Correlation of partition coefficients in n-heptane-aqueous systems with buccal absorption data for a series of amines and acids. *J. Pharm. Pharmacol.* 21, Suppl:144S+.
- Beckett, A.H., Moffat, A.C., 1971. The buccal absorption of some barbiturates. *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 15–18.
- Belgamwar, V., Shah, V., Surana, S.J., 2009. Formulation and evaluation of oral mucoadhesive multiparticulate system containing metoprolol tartarate: an in vitro-ex vivo characterization. *Curr. Drug Deliv.* 6, 113–121.
- Bhardwaj, T.R., Kanwar, M., Lal, R., Gupta, A., 2000. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26, 1025–1038.

- Boulmedarat, L., Bochot, A., Lesieur, S., Fattal, E., 2005. Evaluation of buccal methyl-beta-cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *J. Pharm. Sci.* 94, 1300–1309.
- Ceulemans, J., Vinckier, I., Ludwig, A., 2002. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. *J. Pharm. Sci.* 91, 1117–1127.
- Chang, J.Y., Oh, Y.K., Choi, H., Kim, Y.B., Kim, C.-K., 2002. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *Int. J. Pharm.* 241, 155–163.
- Chen, C.C., Fang, C.L., Al-Suwayeh, S.A., Leu, Y.L., Fang, J.Y., 2011. Transdermal delivery of selegiline from alginate–Pluronic composite thermogels. *Int. J. Pharm.* 415, 119–128.
- Chen, J., Zhou, R., Li, L., Li, B., Zhang, X., Su, J., 2013. Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/ poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. *Mol.* 18, 12415–12425.
- Chickering, D.E., Harris, W.P., Mathiowitz, E., 1995. A microtensiometer for the analysis of bioadhesive microspheres. *Biomed. Instrum. Technol.* 29, 501–512.
- Choi, H., Lee, M., Kim, M., Kim, C., 1999. Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. *Int. J. Pharm.* 190, 13–19.
- Christensen, F.N., Davis, S.S., Hardy, J.G., Taylor, M.J., Whalley, D.R., Wilson, C.G., 1985. The use of gamma scintigraphy to follow the gastrointestinal transit of pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 91–95.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A., 2000. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 43, 207–223.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133.
- Cours Médecine, Ostéopathie - Physiologie - - Partie 2 : La sécrétion salivaire [WWW Document], 2010. URL <http://www.cours-medecine.info/physiologie/secretion-salivaire.html> (accessed 12.3.14).
- Cours Paris 5, 2014. Histologie et anatomie de la muqueuse buccale [WWW Document]. URL <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-dermatologie/Path%20Bucal/histoanatomie/histoanatframes.asp> (accessed 10.27.14).
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* 67, 217–223.
- Das, N., Madan, P., Lin, S., 2010. Development and in vitro evaluation of insulin-loaded buccal Pluronic F-127 gels. *Pharm. Dev. Technol.* 15, 192–208.
- Davidovich-Pinhas, M., Bianco-Peled, H., 2010. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 259–271.
- De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Paderni, C., Campisi, G., Giannola, L.I., 2008. Evaluation of galantamine transbuccal absorption by reconstituted human oral epithelium and porcine tissue as buccal mucosa models: Part I. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 869–873.
- Delvadia, P.R., Barr, W.H., Karnes, H.T., 2012. A biorelevant in vitro release/permeation system for oral transmucosal dosage forms. *Int. J. Pharm.* 430, 104–113.
- Dodou, D., Breedveld, P., Wieringa, P.A., 2005. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 1–16.
- Dodson, L.G., Vogt, R.A., Marks, J., Reichardt, C., Crespo-Hernández, C.E., 2011. Photophysical and photochemical properties of the pharmaceutical compound salbutamol in aqueous solutions. *Chemosphere.* 83, 1513–1523.
- Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C., 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728.
- Edsman, K., Carlfors, J., Petersson, R., 1998. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 105–112.
- Edsman, K., Hägerström, H., 2005. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 3–22.

- Eirheim, H.U., Bundgaard, C., Nielsen, H.M., 2004. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. *Toxicol. Vitro*. 18, 649–657.
- Engblom, J., Engström, S., Fontell, K., 1995. The effect of the skin penetration enhancer Azone® on fatty acid-sodium soap-water mixtures. *J. Control. Release*. 33, 299–305.
- Exner, A.A., Krupka, T.M., Scherrer, K., Teets, J.M., 2005. Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers. *J. Control. Release*. 106, 188–197.
- Fábregas, J.L., García, N., 1995. “In Vitro” Studies on Buccoadhesive Tablet Formulations of Hydrocortisone Hemisuccinate. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, 1689–1696.
- Forte, J.G., Schultz, S.G., 1989. Salivary, Gastric, Pancreatic, and Hepatobiliary Secretion. in: *Handbook of Physiology: Section 6: The Gastrointestinal System Volume III*; Subsequent edition. ed. Oxford University Press, Bethesda, Maryland, USA.
- Galey, W.R., Lonsdale, H.K., Nacht, S., 1976. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J. Invest. Dermatol.* 67, 713–717.
- Gandhi, R.B., Robinson, J.R., 1994. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 13, 43–74.
- Glantzmann, J.-M., Raton, J.-L., 2007. A Review of Dissolution tests with the Flow Through Method [WWW Document]. -PharmaTechnologist.com. URL <http://www.in-pharmatechnologist.com/smartlead/view/199767/4/A-Review-of-Dissolution-tests-with-the-Flow-Through-Method> (accessed 12.30.14).
- GlaxoSmithKline Inc., 2007. GSK-Monographie de produit : Solution Ventolin pour respirateur.
- GlaxoSmithKline Inc., 2011. Product monograph : Ventolin I.V. infusion solution.
- Goswami, T., Jasti, B., Li, X., 2008. Sublingual drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 25, 449–484.
- Grabovac, V., Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A., 2005. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1713–1723.
- Gray, V., Kelly, G., Xia, M., Butler, C., Thomas, S., Mayock, S., 2009. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharm. Res.* 26, 1289–1302.
- Guo, D.D., Moon, H.S., Arote, R., Seo, J.H., Quan, J.S., Choi, Y.J., Cho, C.S., 2007. Enhanced anticancer effect of conjugated linoleic acid by conjugation with Pluronic F127 on MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 254, 244–254.
- Hägerström, H., Edsman, K., 2001. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1589–1599.
- Hägerström, H., Strømme, M., Edsman, K., 2005. Drug molecules as probes for studying the compatibility between gels and mucous tissue with dielectric spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 94, 1090–1100.
- Hakes, L. B., Corby, T. C., Meakin, B. J., 1979. The Stability of Salbutamol Solution. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 25–25.
- Harris, D., Robinson, J.R., 1992. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J. Pharm. Sci.* 81, 1–10.
- Hassan, E.E., Gallo, J.M., 1990. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm. Res.* 7, 491–495.
- Hassan, N., Ahad, A., Ali, M., Ali, J., 2010. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 97–112.
- Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Juras, D.V., Greenberg, M., Kerr, A.R., Lockhart, P.B., Patton, L.L., Porter, S., Thornhill, M.H., 2012. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 16–28.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L., 1998. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 166, 75–88.
- Hoare, T.R., Kohane, D.S., 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 49, 1993–2007.
- Holm, R., Meng-Lund, E., Andersen, M.B., Jespersen, M.L., Karlsson, J.-J., Garmer, M., Jørgensen, E.B., Jacobsen, J., 2013. In vitro, ex vivo and in vivo examination of buccal absorption of metoprolol with varying pH in TR146 cell culture, porcine buccal mucosa and Göttingen minipigs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 117–124.

- Hsu, S.H., Leu, Y.L., Hu, J.W., Fang, J.Y., 2009. Physicochemical characterization and drug release of thermosensitive hydrogels composed of a hyaluronic acid/pluronic f127 graft. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 57, 453–458.
- <http://fr.wikipedia.org/>, 2014. Salbutamol. Wikipédia.
- http://mm.msd-france.com/manuel_merck/, 2013. ASTHME-Manuel Merck- [WWW Document]. Man. Merck. URL http://mm.msd-france.com/manuel_merck/06pula31.html (accessed 2.13.13).
- <http://sante.lefigaro.fr/>, 2010. Voies de recherche inédites contre l’asthme sévère [WWW Document]. URL <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2010/04/06/10155-voies-recherche-inedites-contre-lasthme-severe> (accessed 1.5.15).
- <http://www.directindustry.fr/>, 2014a. Testeur de dissolution / automatique - BIO-DIS - Agilent Technologies - Life Sciences and Chemical [WWW Document]. URL <http://www.directindustry.fr/prod/agilent-technologies-life-sciences-and-chemical/testeurs-dissolution-automatiques-32598-559041.html> (accessed 12.30.14).
- <http://www.directindustry.fr/>, 2014b. Testeur de dissolution / semi-automatique - USP 4 series - SOTAX [WWW Document]. URL <http://www.directindustry.fr/prod/sotax/testeurs-dissolution-semi-automatiques-64747-551687.html> (accessed 12.30.14).
- <http://www.phe-culturecollections.org.uk/>, 2013. General Cell Collection TR146 [WWW Document]. URL http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=10032305&collection=ecacc_gc (accessed 4.22.14).
- <http://www.vidal.fr/>, 2015. Médicaments contenant la substance active seule - salbutamol - Vidal.fr [WWW Document]. URL <http://www.vidal.fr/substances/liste/type:mono/id:3112/> (accessed 1.5.15).
- <http://www.who.int/respiratory/asthma/fr/>, 2015. OMS | L’asthme [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/respiratory/asthma/fr/> (accessed 1.5.15).
- Humphrey, S.P., Williamson, R.T., 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 85, 162–169.
- Ijzerman, A.P., Bultsma, T., Timmerman, H., Zaagsma, J., 1984. The ionization of beta-adrenoceptor agonists: a method for unravelling ionization schemes. *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 11–15.
- Ikeuchi-Takahashi, Y., Watanabe, N., Sasatsu, M., Onishi, H., 2013. Formulation and evaluation of matrix type mucoadhesive tablets aimed at treating oral aphtha. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 1254–1261.
- Imboden, R., Imanidis, G., 1999. Effect of the amphoteric properties of salbutamol on its release rate through a polypropylene control membrane. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 161–167.
- Inoue, H., Ono, K., Masuda, W., Inagaki, T., Yokota, M., Inenaga, K., 2008. Rheological Properties of Human Saliva and Salivary Mucins. *J. Oral Biosci.* 50, 134–141.
- Jacobsen, J., Bjerregaard, S., Pedersen, M., 1999a. Cyclodextrin inclusion complexes of antimycotics intended to act in the oral cavity--drug supersaturation, toxicity on TR146 cells and release from a delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 217–224.
- Jacobsen, J., Nielsen, E.B., Brøndum-Nielsen, K., Christensen, M.E., Olin, H.B., Tommerup, N., Rassing, M.R., 1999b. Filter-grown TR146 cells as an in vitro model of human buccal epithelial permeability. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 138–146.
- Jacobsen, J., van Deurs, B., Pedersen, M., Rassing, M.R., 1995. TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. *Int. J. Pharm.* 125, 165–184.
- Jacques, Y., Buri, P., 1997. An investigation of the physical behaviour of moisture-activated mucoadhesive hydrogels upon contact with biological and non-biological substrates. *Pharm. Acta Helv.* 72, 225–232.
- Jain, A.C., Aungst, B.J., Adeyeye, M.C., 2002. Development and in vivo evaluation of buccal tablets prepared using danazol-sulfobutylether 7 beta-cyclodextrin (SBE 7) complexes. *J. Pharm. Sci.* 91, 1659–1668.
- Janson, C., 1991. Plasma levels and effects of salbutamol after inhaled or i.v. administration in stable asthma. *Eur. Respir. J.* 4, 544–550.

- Jantratid, E., De Maio, V., Ronda, E., Mattavelli, V., Vertzoni, M., Dressman, J.B., 2009. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37, 434–441.
- Jones, D.S., Bruschi, M.L., de Freitas, O., Gremião, M.P.D., Lara, E.H.G., Andrews, G.P., 2009. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int. J. Pharm.* 372, 49–58.
- Kafedjiiski, K., Jetti, R.K.R., Föger, F., Hoyer, H., Werle, M., Hoffer, M., Bernkop-Schnürch, A., 2007. Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. *Int. J. Pharm.* 343, 48–58.
- Kanjanabat, S., Pongjanyakul, T., 2011. Preparation and Characterization of Nicotine–Magnesium Aluminum Silicate Complex-Loaded Sodium Alginate Matrix Tablets for Buccal Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 12, 683–692.
- Karavana, S.Y., Güneri, P., Ertan, G., 2009. Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: preparation, rheological, textural, mucoadhesive and release properties. *Pharm. Dev. Technol.* 14, 623–631.
- Khutoryanskiy, V.V., 2011. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* 11, 748–764.
- Koffi, A.A., Agnely, F., Ponchel, G., Grossiord, J.L., 2006. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 328–335.
- Kremser, C., Albrecht, K., Greindl, M., Wolf, C., Debbage, P., Bernkop-Schnürch, A., 2008. In vivo determination of the time and location of mucoadhesive drug delivery systems disintegration in the gastrointestinal tract. *Magn. Reson. Imaging* 26, 638–643.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., Jasti, B., 2010. Porcine buccal mucosa as in vitro model: effect of biological and experimental variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., Jasti, B., 2009. Porcine buccal mucosa as an in vitro model: relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J. Pharm. Sci.* 98, 471–483.
- Lee, J.W., Park, J.H., Robinson, J.R., 2000. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J. Pharm. Sci.* 89, 850–866.
- Lee, V.H.L., 1990. Protease inhibitors and penetration enhancers as approaches to modify peptide absorption. *J. Control. Release.* 13, 213–223.
- Leitner, V.M., Walker, G.F., Bernkop-Schnürch, A., 2003. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 207–214.
- Le Ray, A.M., Iooss, P., Gouyette, A., Vonarx, V., Patrice, T., Merle, C., 1999. Development of a “continuous-flow adhesion cell” for the assessment of hydrogel adhesion. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 897–904.
- Lin, C.C., Metters, A.T., 2006. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1379–1408.
- Ludwig, A., 2005. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1595–1639.
- Luessen, H.L., Verhoef, J.C., de Boer, A. (Bert) G., Junginger, H.E., de Leeuw, B.J., Gerrit, B., Lehr, C.-M., 1999. Multifunctional Polymers for the Peroral Delivery of Peptide Drugs, in: *Bioadhesive Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. CRC Press. London, UK. 299–339.
- Luo, C.-L., Chen, X.-P., Li, L.-L., Li, Q.-Q., Li, B.-X., Xue, A.-M., Xu, H.-F., Dai, D.-K., Shen, Y.-W., Tao, L.-Y., Zhao, Z.-Q., 2013. Poloxamer 188 attenuates in vitro traumatic brain injury-induced mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization damage in cultured primary neurons. *J. Neurotrauma.* 30, 597–607.
- Madsen, F., Eberth, K., Smart, J.D., 1998a. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. *J. Control. Release.* 50, 167–178.

- Madsen, F., Eberth, K., Smart, J.D., 1998b. A rheological assessment of the nature of interactions between mucoadhesive polymers and a homogenised mucus gel. *Biomaterials*. 19, 1083–1092.
- Mälkki-Laine, L., Hartikainen, E., 1996. Electrokinetic behaviour of salbutamol and its decomposition products and determination of salbutamol by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A*. 724, 297–306.
- Mälkki-Laine, L., Purra, K., Kähkönen, K., Tammilehto, S., 1995. Decomposition of salbutamol in aqueous solutions. II. The effect of buffer species, pH, buffer concentration and antioxidants. *Int. J. Pharm.* 117, 189–195.
- Mälkki-Laine, L., Tammilehto, S., 1990. Decomposition of salbutamol in aqueous solutions. I. The effect of pH, temperature and drug concentration. *Int. J. Pharm.* 63, 17–22.
- Mälkki-Laine, L., Tammilehto, S., 1993. Optimization of the separation of salbutamol and its decomposition products by liquid chromatography with diode-array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 79–84.
- Marttin, E., Verhoef, J.C., Cullander, C., Romeijn, S.G., Nagelkerke, J.F., Merkus, F.W., 1997. Confocal laser scanning microscopic visualization of the transport of dextrans after nasal administration to rats: effects of absorption enhancers. *Pharm. Res.* 14, 631–637.
- Marttin, E., Verhoef, J.C., Spies, F., van der Meulen, J., Nagelkerke, J.F., Koerten, H.K., Merkus, F.W., 1999. The effect of methylated beta-cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualization studies. *J. Control. Release*. 57, 205–213.
- Mashru, R., Sutariya, V., Sankalia, M., Sankalia, J., 2005. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 54–62.
- Mathiowitz, E., Chickering III, D.E., Lehr, C.M., 1999. *Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches, and Development*. CRC Press. London, UK.
- Moore JW, 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharma Tech* 64–74.
- Mørck Nielsen, H., Rømer Rassing, M., 2000. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: V. Enzyme activity of the TR146 cell culture model, human buccal epithelium and porcine buccal epithelium, and permeability of leu-enkephalin. *Int. J. Pharm.* 200, 261–270.
- Morgan, D.J., Paull, J.D., Richmond, B.H., Wilson-Evered, E., Ziccone, S.P., 1986. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulphate conjugate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22, 587–593.
- Morishita, M., Barichello, J.M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S., Nagai, T., 2001. Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 212, 289–293.
- Mughal, M.A., Iqbal, Z., Neau, S.H., 2011. Guar gum, xanthan gum, and HPMC can define release mechanisms and sustain release of propranolol hydrochloride. *AAPS PharmSciTech.* 12, 77–87.
- Munday, D.L., Cox, P.J., 2000. Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* 203, 179–192.
- Nafee, N.A., Ismail, F.A., Boraie, N.A., Mortada, L.M., 2004a. Mucoadhesive delivery systems. II. Formulation and in-vitro/in-vivo evaluation of buccal mucoadhesive tablets containing water-soluble drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 995–1004.
- Nafee, N.A., Ismail, F.A., Boraie, N.A., Mortada, L.M., 2004b. Mucoadhesive Delivery Systems. I. Evaluation of Mucoadhesive Polymers for Buccal Tablet Formulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 985–993.
- Nicolazzo, J.A., Finnin, B.C., 2008. In Vivo and In Vitro Models for Assessing Drug Absorption Across the Buccal Mucosa, in: Ehrhardt, C., Kim, K.J. (Eds.). *Drug Absorption Studies, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*. Springer US. New York, USA. 7, 89–111.
- Nicolazzo, J.A., Reed, B.L., Finnin, B.C., 2003. The effect of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *J. Pharm. Sci.* 92, 2399–2410.
- Nicolazzo, J.A., Reed, B.L., Finnin, B.C., 2005. Buccal penetration enhancers--how do they really work? *J. Control. Release*. 105, 1–15.

- Nielsen, H.M., Rassing, M.R., 2000. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and beta-adrenoceptor antagonists. Comparison to human, monkey and porcine buccal mucosa. *Int. J. Pharm.* 194, 155–167.
- Nielsen, L.S., Schubert, L., Hansen, J., 1998. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 231–239.
- Norris, D.A., Puri, N., Sinko, P.J., 1998. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 34, 135–154.
- O'Hara, T., Dunne, A., Butler, J., Devane, J., 1998. A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1, 214–223.
- Paderni, C., Compilato, D., Giannola, L.I., Campisi, G., 2012. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 114, 25–34.
- Patel, A., Mequanint, K., 2011. Hydrogel Biomaterials, in: Fazel, R. (Ed.), *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>.
- Patel, M.M., Smart, J.D., Nevell, T.G., Ewen, R.J., Eaton, P.J., Tsibouklis, J., 2003. Mucin/poly(acrylic acid) interactions: a spectroscopic investigation of mucoadhesion. *Biomacromolecules* 4, 1184–1190.
- Patel, R.S., Poddar, S.S., 2009. Development and characterization of mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulphate. *Curr. Drug Deliv.* 6, 140–144.
- Patel, V.F., Liu, F., Brown, M.B., 2011. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Release.* 153, 106–116.
- Patel, V.F., Liu, F., Brown, M.B., 2012. Modeling the oral cavity: in vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. *J. Control. Release.* 161, 746–756.
- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27–46.
- Peppas, N.A., Huang, Y., 2004. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1675–1687.
- Peppas, N.A., Sahlin, J.J., 1996. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials* 17, 1553–1561.
- Pharmacopée Européenne 7.0, 2008. Poloxamères, in: *Pharmacopée Européenne 7.0*. Strasbourg, France.
- PharmaTutor, 2015. FORMULATION AND EVALUATION OF AMOXICILLIN TRIHYDRATE MODIFIED RELEASE DOSAGE FORMS | PharmaTutor [WWW Document]. URL <http://www.pharmatutor.org/articles/formulation-evaluation-amoxicillin-trihydrate-modified-release-dosage-forms?page=0,13> (accessed 3.25.15)
- Pickering, G., Macian, N., Libert, F., Cardot, J.M., Coissard, S., Perovitch, P., Maury, M., Dubray, C., 2014. Buccal acetaminophen provides fast analgesia: two randomized clinical trials in healthy volunteers. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 1621–1627.
- Portero, A., Teijeiro-Osorio, D., Alonso, M.J., Remuñán-López, C., 2007. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydr. Polym.* 68, 617–625.
- Puratchikody, A., Prasanth, V.V., Mathew, S.T., Kumar, B.A., 2011. Development and characterization of mucoadhesive patches of salbutamol sulfate for unidirectional buccal drug delivery. *Acta Pharm.* 61, 157–170.
- Puratchikody, A., Prasanth, V.V., Mathew, S.T., Kumar, B.A., 2011. Mucoadhesive patches of Salbutamol sulphate for unidirectional buccal drug delivery: development and evaluation. *Curr. Drug Deliv.* 8, 416–425.
- Qi, H., Chen, W., Huang, C., Li, L., Chen, C., Li, W., Wu, C., 2007. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *Int. J. Pharm.* 337, 178–187.
- Qiu, Y., Park, K., 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 321–339.

- Rao, K.V.R., Buri, P., 1989. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 52, 265–270.
- Rathbone, M.J., Tucker, I.G., 1993. Mechanisms, barriers and pathways of oral mucosal drug permeation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 12, 41–60.
- Ricci, E.J., Lunardi, L.O., Nanclares, D.M.A., Marchetti, J.M., 2005. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 288, 235–244.
- Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Caramella, C., 2000. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 251–257.
- Rowe, R., Sheskey, P., Owen, S., 2005. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed. London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA.
- Ruel-Gariépy, E., Leroux, J.C., 2004. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 409–426.
- Salamat-Miller, N., Chittchang, M., Johnston, T.P., 2005. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1666–1691.
- Sander, C., Nielsen, H.M., Jacobsen, J., 2013. Buccal delivery of metformin: TR146 cell culture model evaluating the use of bioadhesive chitosan discs for drug permeability enhancement. *Int. J. Pharm.* 458, 254–261.
- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Rossi, S., Del Fante, C., Perotti, C., Gallanti, A., Caramella, C., 2011. An in situ gelling buccal spray containing platelet lysate for the treatment of oral mucositis. *Curr. Drug Discov. Technol.* 8, 277–285.
- Senthil, V., Kumar, S., Nagaraju, C.V., Jawahar, N., Ganesh, G., Gowthamarajan, K., 2010. Design and development of hydrogel nanoparticles for mercaptopurine. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1, 334.
- Serbest, G., Horwitz, J., Jost, M., Barbee, K., 2006. Mechanisms of cell death and neuroprotection by poloxamer 188 after mechanical trauma. *FASEB J.* 20, 308–310.
- Shastri, D.H., Prajapati, S.T., Patel, L.D., 2010. Design and Development of Thermoreversible Ophthalmic In Situ Hydrogel of Moxifloxacin HCl. *Curr. Drug Deliv.* Epub ahead of print.
- Shin, S.C., Kim, J.Y., Oh, I.J., 2000. Mucoadhesive and physicochemical characterization of Carbopol-Poloxamer gels containing triamcinolone acetonide. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26, 307–312.
- Shojaei, A.H., 1998. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1, 15–30.
- Singh, S., Soni, R., Rawat, M.K., Jain, A., Deshpande, S.B., Deshpande, S.B., Singh, S.K., Muthu, M.S., 2010. In vitro and in vivo evaluation of buccal bioadhesive films containing salbutamol sulphate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 58, 307–311.
- Slomiany, B.L., Murty, V.L., Piotrowski, J., Slomiany, A., 1996. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen. Pharmacol.* 27, 761–771.
- Smart, J.D., 2005. Buccal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 507–517.
- Smistad, G., Jacobsen, J., Sande, S.A., 2007. Multivariate toxicity screening of liposomal formulations on a human buccal cell line. *Int. J. Pharm.* 330, 14–22.
- Sogias, I.A., Williams, A.C., Khutoryanskiy, V.V., 2008. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 9, 1837–1842.
- Stoughton, R.R., McClure, W.O., 1983. Azon®: A New Non-Toxic Enhancer of Cutaneous Penetration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9, 725–744.
- Su, Y.-L., Wei, X.-F., Liu, H.-Z., 2003. Effect of sodium chloride on association behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 264, 526–531.
- Swarbrick, J., Boylan, J.C., 2000. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Volume 20 - Supplement 3*. CRC Press. London, UK.
- Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2005. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1583–1594.
- Tamburic, S., Craig, D.Q.M., 1997. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44, 159–167.

- Thériaque-<http://www.theriaque.org/> [WWW Document], 2015. URL <http://www.theriaque.org/apps/contenu/accueil.php> (accessed 1.30.15).
- Ur-Rehman, T., Tavelin, S., Gröbner, G., 2011. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 409, 19–29.
- U.S. Pharmacopeial Convention (Ed.), 2013a. USP 36 - NF 31, 36th ed, Dissolution. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, USA.
- U.S. Pharmacopeial Convention (Ed.), 2013b. USP 36-NF 31: (1724) Semisolid drug products- Performance tests.
- Vadnere, M., Amidon, G., 1984. Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols. *Int. J. Pharm.* 22, 207–218.
- Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E., 2011. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*. 12, 1387–1408.
- Varshosaz, J., Tavakoli, N., Kheirilahi, F., 2006. Use of hydrophilic natural gums in formulation of sustained-release matrix tablets of tramadol hydrochloride. *AAPS PharmSciTech.* 7, 168–174.
- Vasanth, P.V., Puratchikody, A., Mathew, S.T., Balaraman, A.K., 2011. Development and characterization of Eudragit based mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulfate. *Saudi Pharm. J.* 19, 207–214.
- Verhoeven, E., Vervaet, C., Remon, J.P., 2006. Xanthan gum to tailor drug release of sustained-release ethylcellulose mini-matrices prepared via hot-melt extrusion: in vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 320–330.
- Vermani, K., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., 2002. Assemblies for in vitro measurement of bioadhesive strength and retention characteristics in simulated vaginal environment. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 1133–1146.
- Veuilleux, F., Kalia, Y.N., Jacques, Y., Deshusses, J., Buri, P., 2001. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51, 93–109.
- Walker, G.F., Langoth, N., Bernkop-Schnürch, A., 2002. Peptidase activity on the surface of the porcine buccal mucosa. *Int. J. Pharm.* 233, 141–147.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376.
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 185, 117–118.
- Xuan, J.J., Yan, Y.D., Oh, D.H., Choi, Y.K., Yong, C.S., Choi, H.G., 2011. Development of thermo-sensitive injectable hydrogel with sustained release of doxorubicin: rheological characterization and in vivo evaluation in rats. *Drug Deliv.* 18, 305–311.
- Xue, X., Zhou, Y., Chen, Y., Meng, J., Jia, M., Hou, Z., Bai, H., Mao, X., Luo, X., 2012. Promoting effects of chemical permeation enhancers on insulin permeation across TR146 cell model of buccal epithelium in vitro. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 199–207.
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., Huang, L., 2010. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 170–178.
- Yuksel, N., Kanik, A.E., Baykara, T., 2000. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *Int. J. Pharm.* 209, 57–67.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S., 2010. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 12, 263–271.